Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Hans Roemer

Untersuchungen über die alkalische Phosphatase im Serum von Schwangeren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Uta Bowe
aus Norden

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0050

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Hans Roemer

Untersuchungen über die alkalische Phosphatase im Serum von Schwangeren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Uta Bowe
aus Norden

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann
1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich
für die freundliche Überlassung des
Themas und des Laborplatzes.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. V. Unbehaun,
der mir bei der Durchführung der Arbeit wert-
volle Hilfe geleistet hat.

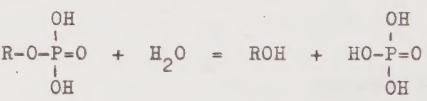
Inhaltsverzeichnis

	Seite
A.Einleitung	2
B.Methodik	17
1.Bestimmung der Enzymaktivität	17
2.Methodik der aP Bestimmung nach säulenchromatographischer Fraktionierung	21
3.Placentaextrakt	23
C.Ergebnisse	24
1.Elutionsprofile gesunder Nichtschwangerer	24
2.Elutionsprofile gesunder Schwangerer	25
3.Elutionsprofile von Placentahomogenat	26
D.Diskussion	41
E.Zusammenfassung	44
F.Literaturverzeichnis	45

Untersuchungen über die alkalische Phosphatase im Serum von Schwangeren

A. Einleitung

Seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts ist die alkalische Phosphatase (aP) bekannt. Bereits 1930 zeigte Kay (14), daß die aP des Serums bei Knochenerkrankungen stark erhöht ist, und daß ihre Aktivität gewöhnlich mit der Schwere der Krankheit korrespondiert. 1932 folgten von Jenner, Kay und Bodanski (15) erste Versuche zur Bestimmung der aP.
Die aP gehört zu den sogenannten Phosphomonester-Hydrolasen und innerhalb dieser Gruppe zu den Enzymen mit relativ breiter Spezifität, den gruppenspezifischen Phosphomonoesterasen. Nach dem pH-Optimum ihrer Wirkung unterscheidet man bei den Phosphomonoesterasen zwischen zwei Enzymen gleichen systematischen Namens: Orthophosphomonoester Phosphohydrolase - mit Trivalnamen alkalische und saure Phosphatase.
Die hydrolytische Spaltung von Phosphomonestern durch die aP läßt sich ganz allgemein durch folgende Gleichung darstellen:



Dabei erfolgt die Spaltung an der P-O Bindung, wie bei Versuchen in mit ^{18}O angereichertem Wasser gezeigt werden konnte. Ein Atom ^{18}O wurde dabei in jedes freigesetzte Molekül Orthophosphat aufgenommen. Die aP kann den Phosphatrest aus ihren Substraten nicht nur im Sinn der Hydrolyse auf Wasser, sondern auch als echte Übertragungsreaktion auf andere Acceptoren des Typus ROH übertragen. Als Acceptoren dienen

vor allem Alkohole, als Donatoren Phenylphosphat, Kreatinphosphat und Phosphoenolpyruvat (17).
Nach der Klassifikation von Folley und Kay hat die aP ihr pH-Optimum bei 9,3. Sie ist aktivierbar durch Ionen zweiwertiger Metalle, vor allem durch Mg^{++}.
In schwächerem Ausmaß aktivieren auch Mn^{++}, Zn^{++} und Co^{++} ebenso wie Aminosäuren, die eine Schutzwirkung durch Bindung von hemmenden Schwermetallionen wie z.B. Cu^{++} ausüben.
Zu den Inhibitoren zählen metallchelatbildende Agentien (vor allem EDTA), bestimmte zweiwertige Kationen wie: Cu^{++}, Ba^{++}, die als Antagonisten zu Mg^{++} wirken, CN^{-} und SH^{-} Verbindungen, Orthophosphat und verwandte polyvalente Anionen wie Arsenat, Borat, Carbonat (15).
Die aP kommt in allen Lebewesen außer den grünen Pflanzen vor. Sie findet sich überall dort, wo es zu metabolischen Transportmechanismen über die zelluläre Membran mit Hilfe der Phosphorylisation kommt (18). Beim Menschen ist die Hauptenzymmenge in der Darmschleimhaut, Niere, Leber, Knochen, Milch und im Serum lokalisiert.
Wie gezeigt werden konnte, handelt es sich bei der aP aus den verschiedenen Organen nicht um ein und dasselbe Enzymprotein. Hier liegen Isoenzyme vor, die sich in ihren Eigenschaften und wahrscheinlich in ihrer chemischen Zusammensetzung deutlich unterscheiden. So bestimmte Moss (43) die Michaelis Konstanten der aP aus Knochen, Leber, Niere, Darm und fand dabei jeweils sich unterscheidende Werte.
Bei der Elektrophorese dieser Isoenzyme zeigte er, daß die aP von Leber und Knochen etwas langsamer als Transferrin wandern, während sich diejenigen der Niere und der Darmschleimhaut in der Haptoglobinzone befanden (41).
Hodson beobachtete bei der Elektrophorese die Knochenbande bei den β-Globulinen, die Leberbande zwischen β-Globulin und schnellen α_2-Globulinen und die intestinale Bande bei

den langsamen α_1-Globulinen (16).
Eine Sonderstellung unter den Isoenzymen scheint die aP des Darmes einzunehmen, die durch L+Phenylalanin spezifisch gehemmt (11, 59) und bei der Elektrophorese durch die vorherige Inkubation mit Neuraminidase unbeeinflußt bleibt. (48).
Aufgrund dieser Ergebnisse unterscheidet Robinson mindestens drei Gruppen von nicht spezifischer aP:
1) aP aus Leber, Knochen, Milz und Niere 2) intestinale 3) placentare aP (48). Die gleiche Einteilung findet Landau durch Antigen-Antikörperreaktion und durch Benutzung verschiedener Substrate wie Glycerophosphat, p-Nitrophenylphosphat (25). Sussman dagegen teilt durch immunochemische Methoden die Isoenzyme in drei antigene Typen auf: 1) aus Leber 2) Placenta 3) und anderen Organen (53).

Eine besondere Bedeutung hat das Vorkommen der aP im Serum. Es ist bekannt, daß sich bei bestimmten Krankheiten oder Organläsionen Konzentrationsschwankungen anderer Enzyme im Serum nachweisen lassen, so daß gewisse Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf zu ziehen sind. Analog dieser Tatsache sind die Aktivitätserniedrigungen oder Erhöhungen der aP zur Erkennung bestimmter pathologischer Veränderungen von größter Bedeutung.
Der normale Wert liegt bei Erwachsenen zwischen 20 - 48 mU/ml Serum, während er bei Kindern 38 - 138 mU/ml Serum beträgt. (Eine Phosphataseeinheit ist die in 1l Serum enthaltene Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37 Grad 1mMol p-Nitrophenol freisetzt)(31).
Ein Großteil der aP des Serums stammt aus dem Knochen, wo sie im wesentlichen an der Mineralisation der neugebildeten Knochengrundsubstanz beteiligt ist. Der Osteoblast als Quelle der Knochenphosphatase sezerniert das Enzym in die

extrazelluläre Flüssigkeit. Da von hier ein Übertritt ins Plasma erfolgt, ist die aP des Serums ein Maß für die zelluläre Aktivität der Knochenbildung (12). So ist sowohl der physiologische hohe Wert des Enzyms im Serum bei Kindern zu erklären als auch die Konzentrationserhöhung bei pathologischen Prozessen, die mit vermehrter Osteoblastentätigkeit einhergehen wie bei: florider Rachitis, Osteomalazie, Hyperparathyreoidismus, M. Paget, Osteoporosis circumscripta, Knochentumoren, Osteosarkom, Knochenmetastasen bei Prostata Carzinom (14).

Eine Erniedrigung der aP des Serums findet sich bei allen direkten oder indirekten Wachstumsstörungen auf angeborener Grundlage wie: angeborene Hypophosphatasämie, Achondroplasie, Kretinismus, Vitamin C Mangel und Hypoparathyreoidismus (14).

Aber nicht nur Erkrankungen des Knochensystems sondern ebenso pathologische Veränderungen der Gallenwege und der Leber ändern den aP Spiegel im Serum. Ein starker Anstieg erfolgt bei Leberzellschädigung, wo durch den Untergang der Zellen die aP freigesetzt wird und ins Blut gelangt, so bei: schleichendem Verlauf einer Hepatitis, bei intrahepatischem Verschlußsyndrom in Form der Hepatitis mit cholestatischem Einschlag, bei Obstruktionsikterus infolge eines Neoplasmas und bei Metastasierung eines Tumors in die Leber (14).

Da die aP aus mehreren Quellen stammt, läßt sich ihre Heterogenität auf verschiedene Weise bestimmen.

Schlamowitz (54) fand aufgrund der Präzipitation der aP des Serums (SaP) mit anti-intestinaler und anti-Knochen Phosphatase, daß bei gesunden Personen etwa 40 - 59 % der gesamten SaP aus dem Knochen stammen müssen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt Posen (45) bei Hitzeinaktivierungsversuchen der SaP von Gesunden mit erhöhter

Osteoblastentätigkeit und Patienten mit verschiedenen hepatobiliären Erkrankungen, wobei er jeweils die verschiedenen Inaktivierungszeiten mit denjenigen der Homogenate von Knochen, Leber und Galle vergleicht. Er folgert dann, daß rund 50 - 75 % der gesamten aP bei Normalpersonen Knochenenzym sind.

Bei der Auftrennung von SaP durch Stärkegelelektrophorese fand Moss (42), daß der größte Teil der aP wenig langsamer als Transferrin C wandert, sich also in der β-Globulinfraktion (Knochenenzym) befindet. Robinson (49) beschreibt ein ähnliches Verhalten und fügt hinzu, daß diese Bande durch vorherige Inkubation mit Neuraminidase in der Wandergeschwindigkeit gehemmt wird.

Nach säulenchromatographischer Fraktionierung und anschließender Elektrophorese der SaP gelangte Kotzaurek (24) zu dem Ergebnis, daß sich die höchste aP Aktivität des Normalserums im Transferrinbereich befindet, während bei hepatobiliären Erkrankungen und bei Erkrankungen des Skelets die Hauptaktivität im Globulin des F-α_2-Bereiches liegt.

Im Gegensatz dazu lokalisiert Korner (23) das Aktivitätsmaximum in der α_1-Globulinfraktion, die bei Lebererkrankungen noch höhere Aktivitäten aufweist. Die β-Globulinfraktion (erhöht bei Erkrankungen des Knochens) soll nur die Hälfte der Aktivität der α_2-Globuline besitzen. In den Albuminen befindet sich mehr als 10 % der Gesamtaktivität und in den α_1- und γ-Globulinen weniger als 10 %. Nach Korner stammt demnach die Hauptaktivität der SaP wahrscheinlich aus der Leber und nicht aus dem Knochen (12, 42, 49, 24). Zu der gleichen Folgerung kommen Estborn (10) und Hodson (16), die bei Stärkegelelektrophorese eine in allen Seren konstant vorhandene Bande fanden, die derjenigen des Leberextrakts entsprach.

eine zweite Bande bei der langsamen α_2-Globulinfraktion - entsprechend der intestinalen Bande - und nur gelegentlich eine Knochenbande im β-Globulinbereich.
Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß der Gesamtbetrag der SaP aus mehreren Organen wie Leber, Knochen und Intestinum stammt (16, 54).

1934 beschrieb Coryn (35) zum erstenmal, daß dieses Enzym im Serum einen signifikanten Anstieg in der Spätschwangerschaft erfährt. Cayla und Fabre (57), Meranze et al. (36), Vermehren, Young et al., Hoch et al. (6) und viele andere Autoren bestätigten diesen Befund.
Es erhob sich nun die Frage nach der Quelle und Ursache dieser Erhöhung.
Ramsey (6) vermutete Ca^{++}- und Phosphatmobilisation im Knochen der Mutter, Kerleau und Cayla (38), Ebbs und Scott (9) nahmen einen Transfer von fetalem Osteoblastenenzym über die Placenta in den mütterlichen Kreislauf an, und Wetstone (61) führte die aP Erhöhung auf gesteigerten Knochenstoffwechsel während der Schwangerschaft zurück.
Eine neuere Arbeit von Meade (38) bestätigt mit Hilfe der Elektrophorese, bei der sich im Serum von Schwangeren am Termin nur eine Bande ähnlich der Knochenbande zeigt, daß der Anstieg des Enzyms durch erhöhte P-Ca Mobilisation aus dem Knochen bedingt ist.
Zu einem anderen Ergebnis gelangt Boyer (3). Bei der elektrophoretischen Untersuchung der Heterogenität der SaP fand er verschiedene Zonen, die nach der Reihenfolge ihrer Lage zwischen Kathode und Anode A-F von ihm benannt wurden. Dabei entdeckte er, daß normale Erwachsene eine sogenannte C und F Bande besitzen, daß aber die A und B Zonen, die kathodisch zu Transferrin C lagen nur bei Schwangeren und die D Bande im Zentrum der Haptoglobin 1-1 Bande nur bei schwangeren Negerinnen vorhanden waren.

Diese Zonen, sichtbar von der 15. Woche der Schwangerschaft bis 6 Wochen post partum, bildeten annähernd die Hälfte der gesamten SaP der Mutter, waren jedoch im Nabelschnurblut der Neugeborenen nicht mehr nachweisbar. Boyer bewies nun, daß diese Bande mit den A und B Zonen aus Placentaextrakten identisch waren, das heißt also, daß die Placenta Quelle des Enzyms und verantwortlich für die aP Erhöhung während der Schwangerschaft ist.
Tatsächlich läßt sich in der Placenta ein deutlicher gradueller Anstieg während der Schwangerschaft feststellen. Dabei erreicht die Aktivität am Termin Werte, die 10 mal so hoch wie zu Beginn der Schwangerschaft liegen (20) (nach Curzen etwa 4 mal so hoch)(5). Thomsen und Jonek (58, 21) beschreiben dagegen eine Aktivitätszunahme nur bis zur 30. Woche. Dann erreicht das Enzym ein Maximum, um zur Entbindung hin abzufallen. Repina (46) begründet die Enzymabnahme mit dem verminderten Bedarf des Feten an Phosphor und Ca^{++} Salzen, da das Skelet aufgebaut sei und im Organismus hochaktive oestrogene Hormonfraktionen vor der Geburt sich speicherten, die die Funktion der aP hemmen sollen.

In der normalen Placenta wurde die aP schon vor der 9. Woche nachgewiesen (4), wo sie im Bürstensaum des Syncytiums lokalisiert ist. In der 9. Woche verschwindet sie dann vorübergehend, um nach der 10. Schwangerschaftswoche neu zu erscheinen (34) und an Aktivität zuzunehmen. Dabei fand sich das Enzym weder in der Langhansschen Zellschicht, dem mesenchymalen Bindegewebe noch in der fibrillären Grundsubstanz oder dem Gefäßsystem (58). Einzig das Cytoplasma (58, 4) und dabei vor allem die Bürstensäume des Syncytiotrophoblasten enthielten die gesamte aP Aktivität. Dabei kommt der Hauptanteil (82 %) der Fraktion Cytoplasma und Mikrosomen zu,

Mitochondrien enthalten 11 % bzw. 7 % der aP Aktivität und nur etwa 3 % sind in der Kern Fraktion vorhanden (55).

Die Bedeutung der aP sehen Jonek (21), Lobel (32) und Stark (55) in einer intensiven Beteiligung des Enzyms am aktiven Transport der Nährstoffe vom Blut der Mutter zum Feten, dem Abtransport von Stoffwechselprodukten in den mütterlichen Kreislauf und in einer Steuerung und Regulierung der Stoffwechselvorgänge des Organs selbst. Horky (18) diskutiert eine Stimulation der Dephosphorylierung der Hexosephosphate und Beteiligung bei der Kalkeinlagerung im Gewebe des Feten, da die aP den Übergang des anorganischen Phosphors zum Feten erleichtert und damit die Ossifikation beeinflussen soll. U.U. ist die aP an der Produktion von Oestrogenen und Progesteron beteiligt, da diese Hormone im syncytialen Epithel gebildet werden (58). Ober (44), Levine (28) und Horky (18) beschreiben übereinstimmend im Uterusendometrium eine Zunahme der aP Aktivität in der Proliferationsphase, also unter der Wirkung des Oestrogens und eine Abnahme in der Sekretionsphase, so daß ein gewisser Zusammenhang zwischen der aP und den Oestrogen-Progesteron Hormonen zu bestehen scheint.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß es hinsichtlich der biologischen Funktion der aP vielerlei Theorien gibt, die diskutiert werden. Jedoch scheinen weder die physiologischen Substrate noch der Wirkmechanismus und Angriffspunkt der abgespaltenen Phosphatreste eindeutig bekannt zu sein. Damit ist die spezifische biologische Bedeutung der aP während der Schwangerschaft noch nicht geklärt.

Die Frage der aP Aktivität und deren Bedeutung stellt sich aber nicht nur hinsichtlich normal verlaufender Schwangerschaften, sondern in gleicher Weise auch bei Schwangerschaften, in denen Komplikationen auftraten.

So fand Humke (19) bei Untersuchungen pathologischer Placenten in allen Fällen verminderte Enzymaktivitäten, die er als Ausdruck manifester placentarer Stoffwechselinsuffizienz deutete. Dabei lagen die Werte bei Gestose um 85 %, Erythroblastose bei 70 % und Diabetes um 15 % der Normalaktivität. Thomsen (58) hingegen beschreibt eine Aktivitätszunahme bei Spätgestosen, die er in Zusammenhang mit der Störung des Hormonhaushaltes bringt. Curzen (5) beobachtet einen starken aP Anstieg bei Praeeklampsie, die u.U. auf der gesteigerten Kalzifizierung der Placenta oder auf dem frühen ischämischen Wechsel im Trophoblasten (4) analog der Enzymkonzentrationserhöhung im Serum bei Hepatitis durch Zerstörung von Leberzellen beruhen soll.
Nicht nur in der Aktivitätsänderung sondern auch im Verteilungsmuster der aP in den Zellfraktionen ergab sich bei pathologischen Placenten ein von der Norm abweichendes Bild. Bei krankhaften Veränderungen nimmt die aP Konzentration im Zellkern und in den Mitochondrien zu, da durch Schädigung der Zellstruktur die Permeabilität für das Substrat u.U. erhöht wird, während die Enzymaktivität im Zytoplasma, bedingt durch Abnahme wichtiger biologischer Verbindungen, sinkt (56).

Wie bereits oben erwähnt, fand Boyer (3) aufgrund elektrophoretischer Bestimmungen, daß wahrscheinlich die Placenta Quelle der aP Erhöhung während der Schwangerschaft ist. Tatsächlich läßt sich analog zum Enzymanstieg in der Placenta eine entsprechende Konzentrationserhöhung im Serum Schwangerer feststellen. Allerdings soll die Aktivität im Serum etwa 50 mal schwächer als in der Placenta sein (55).
Bereits von der 15. Woche an (29, 13), deutlicher jedoch von der 32. bzw. 36. Woche an (39, 30), beginnt

ein konstanter allmählicher Anstieg der aP, der unter der Geburt ein Maximum erreicht. Lyngbye und Christofferson (33) geben den Zeitpunkt des Anstiegbeginns mit der 20. bis 25. Woche an, das Maximum in der 39. Woche, worauf dann wieder ein leichter Abfall erfolgen soll. In den ersten 24 Stunden post partum sinkt die aP sehr rasch ab, in den folgenden Tagen nur noch verzögert, so daß noch am 6. Tag nach der Geburt die Werte weit über der oberen Grenze der Normalwerte Nichtgravider liegen (57) und erst nach etwa 20 Tagen den Bereich der Norm erreichen (63). Durch die Placentaausstoßung fällt wahrscheinlich eine Phosphatasequelle fort. Ein weiterer schneller Enzymabfall wie in den ersten Stunden post partum wird durch erneuten Zustrom von Phosphatase, die u.U. aus der Mamma stammt, verzögert (57).

Obwohl bei den einzelnen Schwangeren die absoluten Aktivitätswerte stark schwanken, läßt sich doch aufgrund des kontinuierlichen Anstiegs im Serum ein allgemein gültiges Enzymmuster feststellen. Bei Abweichungen von dieser Kurve ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß der Fetus tot ist, bald sterben wird oder Placentainsuffizienz besteht (39).
Roszkowski (50) fand bei Serumuntersuchung von 85 schwangeren Frauen im ersten Trimester Werte von 2,3 Bodanski-Einheiten (B.E.), im zweiten 3,4 B.E. und im letzten Drittel 5,5 B.E.. In der gleichen Größenordnung liegen die von Lee (27) ermittelten Werte: 5,3 B.E. im dritten Trimester, während Zuckerman (63) Aktivitätssteigerungen bis 16 B.E., Levine (29) bis 20 B.E., Curzen (7) bis 18 King-Armstrong Einheiten (K.A.E.) und Messer (39) 4 - 25 K.A.E. als Durchschnittswerte angeben (siehe Tabelle I).

Autor	aP Aktivität im Serum Gravider 3. Trimester		aP Akt. im Serum Nicht-Gravider		in I.U. umgerechnete E	
					Gravide	Nichtgravide
	B.E.	K.A.E.	B.E.	K.A.E.	I.U.	
Lee	5,3		2,1		43,99	17,43
Roszkowski	5,5		1,9		45,65	15,75
Zuckerman	16				132,8	
Levine	20		1,4-4,5		166	12,45-41,35
Curzon		18			72	
Messer		4-25			16-100	

Tabelle I

Umrechnung der von den Autoren ermittelten Werte in I.U.

1 B.E. = 5,35 I.U. errechnet oder 8,3 I.U. empirisch ermittelt (47)
1 K.A.E. = 7,1 I.U. errechnet oder 4,0 I.U. empirisch ermittelt

Das Minimum für aP Werte sollte jedoch ab der 36. Woche 4 B.E. sein = 32,2 I.U.. Weniger als 3 B.E. (24,9 I.U.) sind Hinweis auf Unreife oder Schädigung des Feten (29, 39, 51). Werte über 5 B.E. (41,5 I.U.) sprechen für Lebensfähigkeit und Reife des Kindes, schließen aber Schädigungen nicht aus (29). Bei Placenta praevia Rh-Inkompatibilität, Hyperemesis gravidarum, Diabetes, kardialer Insuffizienz, Harnwegsinfektionen und Anämie ergaben sich nach Untersuchungen von Zuckerman und Sadovski (63) keine unterschiedlichen Werte zur normalen Schwangerschaft. Levine und Wood (29) fanden jedoch deutlich erniedrigte Aktivitäten. Bei Toxikosen liegt die aP Aktivität weit über den Werten normaler Schwangerer (63, 27, 7, 60).

Bei Zwillingsschwangerschaften ist die Enzymaktivität deutlich erhöht (37). Jaeckock macht dafür jedoch nicht eine gesteigerte Placentaaktivität verantwortlich, sondern erklärt die Erhöhung durch die Zunahme des Placentagewebes (20).
Die aP im Serum Schwangerer unterscheidet sich von der aP Nichtgravider durch verschiedene Eigenschaften, die sie gemeinsam mit der aP der Placenta besitzt, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit die Placenta Quelle des Enzyms und damit Ursache der Konzentrationserhöhung ist.

1) Bei 30 Minuten erhitzen von Serum Nichtgravider und Neugeborener auf 56 Grad zeigte sich, daß annähernd jede Enzymaktivität zerstört war, während sich bei den gleichen Versuchen mit Serum Schwangerer etwa 50 % der aP Aktivität als hitzestabil erwiesen (35). Kitchener und Mitarbeiter beobachteten nach 15 Minuten erhitzen von mütterlichem Blut Inaktivierung auf 68 % des Originalwertes, während fetales Blut nach der gleichen Zeit nur noch etwa 17 % der Aktivität aufwies. Sie schlossen daraus, daß die fetale aP fast vollkommen hitzelabil sein müsse, fanden jedoch weder zwischen der hitzestabilen und -labilen SaP der Mutter noch zwischen der SaP und dem kindlichen Geschlecht, Geburtsgewicht oder Placentagewicht irgendeine Beziehung (22).

Zuckerman u.a. bewahrten Serum Nichtgravider, Gravider, Neugeborener und Serum von Patienten mit Leber- und Knochenerkrankungen 14 Tage bei 37 Grad auf und stellten ein Absinken der aP Aktivität auf den Nullpunkt fest. Da im Serum Schwangerer annähernd die gesamte Enzymaktivität noch vorhanden war, folgerten die Autoren, daß das Enzymprotein der schwangerschaftsspezifischen aP selbst hitzestabil sein müsse, und daß kein stabi-

lisierender Faktor für die aP im Serum Schwangerer vorhanden sei (62).
Da diese schwangerschaftsspezifische, hitzestabile aP in der Placenta 100- bis 200fach höher als im nichtschwangeren Uterus ist, schließt Mc Master daraus, daß die aP der Schwangerschaft placentaren Ursprungs sein müsse. Levine ermittelte bei der Bestimmung der hitzestabilen und hitzelabilen aP in 170 Fällen in der 34. Woche Durchschnittswerte von 4,2 B.E. (34,86 I.U.), davon waren 1,8 B.E. (14,94 I.U.), in der 35. Woche 5,0 B.E. (41,5 I.U.), davon 2,5 B.E. (20,75 I.U.), in der 38. Woche 5,5 B.E. (45,65 I.U.) davon 2,9 B.E. (24,07 I.U.) hitzestabil. Erreicht die Aktivität der gesamten aP 4 B.E., von denen etwa 50 % hitzestabil sind, so ist die Reife des Kindes anzunehmen (30).

Abweichungen von der Norm können zwar in gewisse Beziehung zur Schwere der Krankheit gesetzt, jedoch nicht als Parameter für die Funktion der Placenta gewertet werden. Curzen (7) fand bei 41 Patientinnen mit leichter Praeeklampsie 14,6 % der hitzestabilen aP (HSaP), bei schwerer Eklampsie 78 % außerhalb der Norm. Von 7 perinatalen Todesfällen waren 4 entweder mit steilem Anstieg der HSaP oder mit plötzlichem Abfall verbunden, so daß kein sicherer Zusammenhang zwischen Tod des Kindes und der hitzestabilen Fraktion der aP zu bestehen scheint. In einer neueren Arbeit, bei der serienmäßig aP Bestimmungen im Serum von 10 Schwangeren durchgeführt wurden, konnte Curzen jedoch in 8 Fällen aufgrund des plötzlichen Anstiegs bzw. Abfalls der aP den Tod des Feten 24 Stunden voraussagen (8).
Watson beschreibt nach Absterben des Feten in utero ein langsames Verschwinden der HSaP (60).

2) Wie oben ausführlich beschrieben, gelang es Boyer (3), bei der Elektrophorese des Serums Schwangerer eine Zone

nachzuweisen, die identisch mit derjenigen des Placentaextraktes war und etwas schneller als die bei jedem Erwachsenen vorhandene Transferrin C Bande wandert. Beckmann (1) bestätigte diesen Befund und fand bei der Auftrennung von 100 mütterlichen Seren in 45 % die A Bande (bei Boyer in 54 %) und in 55 % die B Bande vor. Kitchener (22) beschreibt bei der Elektrophorese von unerhitztem mütterlichen Serum zwei Enzymbande, von denen die schnellere und diffusere der Hauptbande im Serum von Normalpersonen entspricht und die langsamere zwischen α_2- und β-Globulin wandernde die gleiche Beweglichkeit wie die aP von frischem Placentahomogenat aufweist.
Zu einem anderen Ergebnis kommt Meade (38), der in Seren von Schwangeren am Termin eine Isoenzymbande beobachtet, die dem schnellen α_2-Globulin entspricht, in Gestalt und Erscheinungsform wie diejenige Bande aus Knochenextrakt ist und sich deutlich von Banden aus Leber und Placentahomogenat unterscheidet. Er schließt daraus, daß die aP Erhöhung auf einer Knochen-Ca^{++}-Mobilisation beruhen muß.

3) Mit immunologischen Methoden versuchten Birkett und Mitarbeiter zu beweisen, daß ein Teil der aP im Serum Schwangerer identisch mit dem Enzym der Placenta sei. Durch Injektion mit aP der Placenta in Kaninchen gewannen sie streng spezifische Antikörper gegen die Placenta. Die Inkubation mit Seren von Normalpersonen und Neugeborenen bewirkte keine Änderung in der aP Aktivität; bei der Inkubation mit Seren Schwangerer verschwand 1/3 der Aktivität, bei Placentaextrakten 5 %. Bei Knochenextrakten ergab sich keine Wirkung. Daraus folgerten sie, daß die aP Erhöhung in der Schwangerschaft auf das im mütterlichen Kreislauf zirkulierende Placentaenzym zurückzuführen sei (2).

Sussman (52) bestimmte mit der gleichen Methode den Anteil der placentaren aP im Serum, fand sie bereits im ersten Trimester im mütterlichen Kreislauf und errechnete, daß sie im dritten Trimester etwa 40 - 60 % der Gesamt-aP ausmacht.
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die aP der Placenta und die schwangerschaftsspezifische aP im Serum Gravider aufgrund histochemischer (analoge Konzentrationserhöhung), physikalischer (Hitzestabilität und EDTA Stabilität (39, 22)), elektrophoretischer und immunologischer Eigenschaften wahrscheinlich identisch sind.

In der folgenden Arbeit wurden in Seren 8 Nichtgravider und 76 Gravider in verschiedenen Schwangerschaftsabschnitten die Gesamt-aP (TaP) und die HSaP bestimmt. Gleichzeitig wurden Seren von 5 Nichtschwangeren, 5 Schwangeren und 2 Placentahomogenate säulenchromatographisch aufgetrennt. Aufgabe der Arbeit war es, zu prüfen, ob die Aktivität der aP sich in mehreren Fraktionen, die verschiedenen Proteinen zugeordnet werden können, befindet und ob u. U. ein anderes Verteilungsmuster des hitzestabilen als des hitzelabilen Enzymanteils vorliegt.
Anschließend sollte im Vergleich mit dem Elutionsprofil der Placentahomogenate beurteilt werden, ob sich - ähnlich wie bei der Elektrophorese - auch bei der säulenchromatographischen Fraktionierung ein im Serum und in der Placenta gleiches Muster nachweisen läßt.

B. Methodik

1. Bestimmung der Enzymaktivität

Im Serum von 8 nichtschwangeren und 76 schwangeren Frauen wurde die aP mit Hilfe des Biochemika Farb Tests nach Angaben der Herstellerfirma bestimmt.
Prinzip: als Substrat für die Messung der aP wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet. Nach 30minütiger Inkubation wird die aP durch NaOH total gehemmt, aus dem freigesetzten p-Nitrophenol entsteht das gelbe Anion. Die Phosphataseaktivität ist direkt proportional der Menge des pro Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols (31).

Reagenzien: 0,05 M Glycin-Puffer, pH = 10,5
0,005 M $MgCl_2$
0,0055 M Natrium-p-nitrophenylphosphat
0,02 n NaOH

In zwei Reagenzgläser wurden je 1,0 ml Substrat Puffer-Gemisch pipettiert, dann in eines 0,1 ml unerhitztes Serum hinzugefügt und beide Gläser bei 37 Grad inkubiert. Nach genau 30 Minuten wurden beiden Gläsern 10 ml NaOH hinzugefügt, in den Leerwert außerdem 0,1 ml Serum, die Flüssigkeit gemischt und in Küvetten von 1 cm Schichtdicke gegossen. Das freigesetzte p-Nitrophenol wurde im Eppendorf-Photometer bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Die aP Aktivität errechnete sich durch Multiplikation der Extinktion mit 200 in mU nach der Formel:

$$\text{I.U.} = \frac{\Delta E/\text{min}}{\varepsilon \times d} \times \frac{\Delta V}{\Delta V} \times 10^6$$

ΔE = Extinktion
ε = molarer Extinktionskoeffizient = 18530
d = Schichtdicke der Meßküvette = 1 cm
ΔV = Endvolumen = 11,1 ml

AV = Anfangsvolumen = 0,1 ml

$$I.U. = \frac{\Delta E/min}{18530 \times 1} \times \frac{11,1}{0,1} \times 10^6$$

Da 30 Minuten inkubiert wurde, die Aktivität aber nur pro Minute errechnet wird, muß die Gleichung durch 30 dividiert werden:

$$I.U. = \frac{\Delta E/min}{18530 \times 30} \times \frac{11,1}{0,1} \times 10^6$$

$$I.U. = 199,67 \times E$$

$$I.U. = \Delta E \times 200$$

Anschließend wurden die entsprechenden Seren 30 Minuten im Wasserbad erhitzt und nach obigem Schema die danach noch verbleibende hitzestabile aP bestimmt.

Ergebnisse:

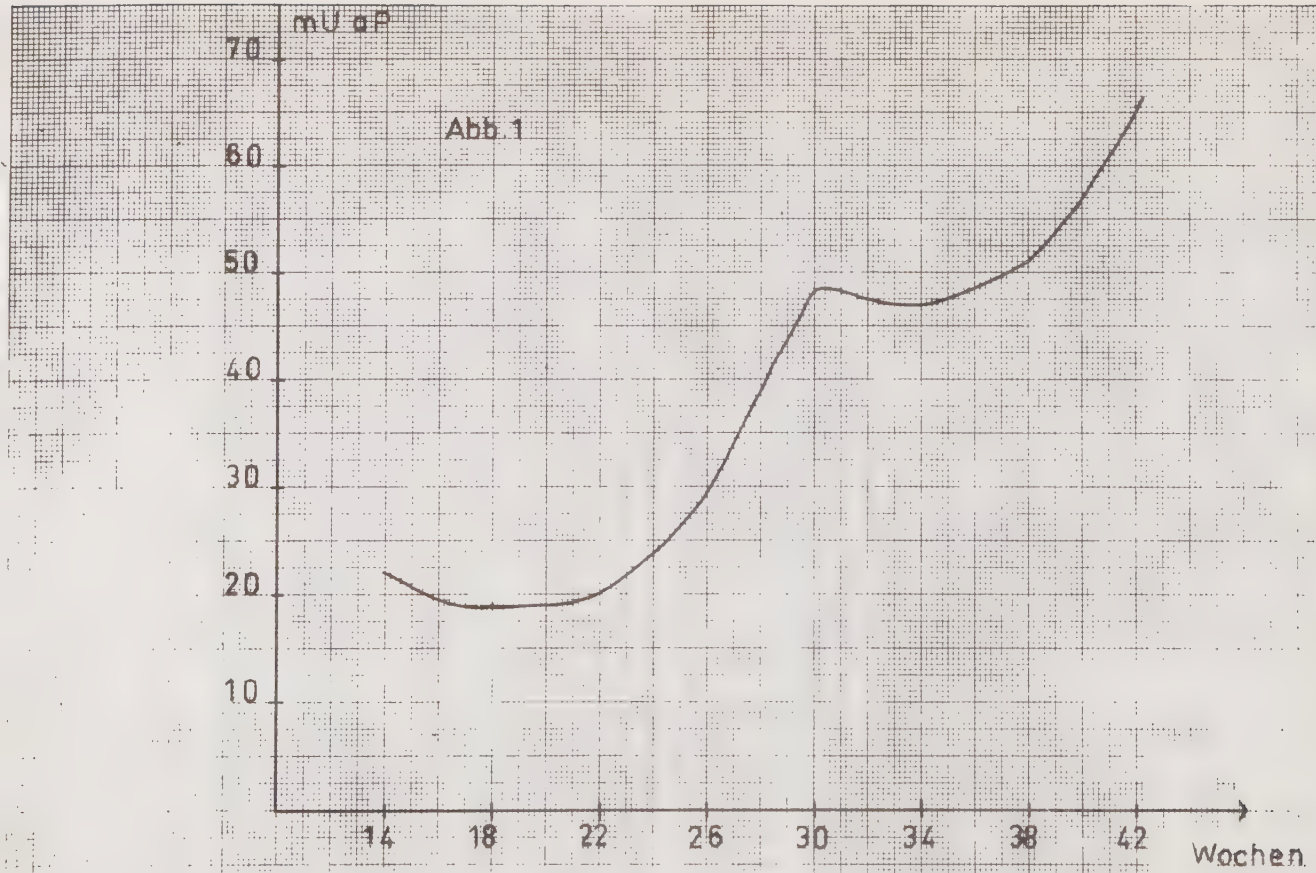
Bei den nichtschwangeren Personen lag der Durchschnittswert der TaP bei 22,4 I.U., etwa genau so hoch wie in der 10. - 18. Schwangerschaftswoche (siehe Tabelle II). Während bei den Nichtschwangeren keine HSaP nachzuweisen war, fand sich in der Gruppe der Schwangeren bereits in der 10. - 14. Woche mit 4,2 I.U. ein deutlicher hitzestabiler Anteil. Die aP Aktivität nahm in der 14. - 18. Woche sowohl in der TaP als auch in der HSaP ab, um dann bis zum Ende der Schwangerschaft, außer einem kleinen Abfall in der 30. - 34. Woche anzusteigen (siehe Abb.1). Die signifikantesten Anstiegsstufen lagen in der 18. - 26. und in der 34. - 42. Schwangerschaftswoche mit etwa 20 I.U. Differenz.
Bei der Berechnung des Verhältnisses der TaP zur HSaP konnte bis zur 30. Woche keine Beziehung zwischen den beiden Fraktionen festgestellt werden. Zum Ende der Schwangerschaft hin ergab sich jedoch, daß etwa 50 % der TaP der schwangerschaftsspezifischen aP zuzurechnen sind.

Dabei fand sich jedoch nicht nur eine Zunahme des hitzestabilen sondern ebenso des hitzelabilen Anteils. Dieser labile Anteil, der zu Beginn der Schwangerschaft bei 18,3 I.U. im Durchschnitt gelegen hatte, stieg zum Termin hin auf 36,16 I.U. an.

Woche	TaP $\bar{x}$	TaP Standard-Abweichung	HSaP $\bar{x}$	HSaP s	TaP/HSaP	hitzelabil. Anteil
Nichtschwangere	22,4	6,42	-	-	-	
10 - 14	22,5	3,813	4,2	3,17	5,3	18,3
14 - 18	19,47	5,26	2,7	3,65	15,5	16,7
18 - 22	19,9	6,929	6,8	3,11	3,4	13,1
22 - 26	29,6	5,5	4,74	3,34	27,4	24,86
26 - 30	46,32	22,3	15,47	14,89	5,7	33,45
30 - 34	47,36	16,67	19,78	11,38	2,9	27,58
34 - 38	36,11	13,28	22,88	10,58	2,6	27,[illegible]
38 - 42	[illegible],36	20,33	24,73	13.64	[illegible],2	36,16

Tabelle II

Anstieg der aP während der Schwangerschaft (Durchschnittswerte)



Anstieg der aP während der Schwangerschaft

2. Methodik der aP Bestimmung nach säulenchromatographischer Fraktionierung

Frisch gewonnenes Serum 5 Nichtgravider und 5 Schwangerer (mens X) wurden säulenchromatographisch fraktioniert. Durch Gelfiltration an Sephadex G-25 wurden die Seren von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Die Säule wurde mit 3 ml Serum beschickt, daraus wurden 6 ml Eluat gewonnen.
Zur weiteren Fraktionierung wurden 5 ml des vorher gewonnenen Eluats auf einen Sephadex DEAE A-50 Ionenaustauscher gegeben. Dieser Austauscher besteht aus quervernetzten Dextranketten und eignet sich besonders zur Trennung hochmolekularer und empfindlicher Stoffe. Das Gel wurde mit verwandtem Puffer äquilibriert und in eine 12,5 x 0,9 cm große Chromatographiesäule gebracht. Das vorgereinigte Serum wurde durch Stufenelution fraktioniert.

Stufe I: 40 ml 0,0572 m Tris-Puffer pH = 7,2
Stufe II: 50 ml 0,05 m NaCL (in Tris-Puffer)
Stufe III: 50 ml 0,1 m NaCL
Stufe IV: 40 ml 0,2 m NaCL
Stufe V: 30 ml 0,4 m NaCL

Diese Mengen hatten sich in Vorversuchen zur Trennung der einzelnen Proteingipfel am günstigsten erwiesen. Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen aufgefangen (Fraction collector LKB Radi-Rac Typ 3402B). Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm (Spektralphotometer Zeiss PQM II 2693). Die Enzymaktivitäten der TaP und HSaP wurden im Ausgangsmaterial, im vorgereinigten Serum und in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Dazu diente ein nach Lauber und Richterich (26) modifizierter Test, der auf dem gleichen Prinzip der

colorimetrischen Enzymaktivitätsmessung, wie angegeben, beruht. Die Messung wird jedoch nicht nach der Zwei-Punkte-Methode sondern nach der kinetischen Methode ausgeführt.

Mikrotest:

Puffer:	0,5	gr Amediol	
	0,25	gr Na_2CO_3	auf 100 ml Aqua dest.
	0,1	gr $NaHCO_3$	
	0,015	gr $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	

Substrat: 10 mg Nitrophenylphosphat pro 10 ml Puffer

Makrotest:

Puffer:	5	gr Amediol	
	2,5	gr Na_2CO_3	auf 800 ml Aqua dest.
	1	gr $NaHCO_3$	
	0,15	gr $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	

Substrat: 10 mg Nitrophenylphosphat pro 10 ml Puffer.

Der Mikrotest wurde für Enzymaktivitätsbestimmungen des unerhitzten und des inaktivierten Ausgangsserums und des vorgereinigten Serums verwandt, der Makrotest für die einzelnen Fraktionen. In einem auf 25 Grad thermostatierten Wasserbad wurde das Puffer-Substrat-Gemisch vorgewärmt. In der geheizten Photometerküvette wurden beim Mikrotest 0,5 ml Puffer-Substrat mit 20 µl Serum, beim Makrotest 2 ml Puffer-Substrat und 0,6 ml Eluat, gut gemischt und bei 405 nm photometriert. Die Enzymaktivität konnte im Photometer mit Hilfe des Registriergeräts bei einem Papiervorschub von 1 cm/min verfolgt werden. Mit Hilfe des Verstärkers wurde die Extinktion in die Nähe von 0 gebracht und dann während 1 - 2 Minuten registriert. Nach der gleichen Versuchsanordnung wurde anschließend die HSaP mit dem Teil jeder Fraktion bestimmt, der bei 56° 1/2 Stunde inkubiert worden war. Die Berechnung der aP Aktivität erfolgte nach der Formel:

Mikrotest:

$$I.U. = \frac{\Delta E/min}{18530} \times \frac{520}{20} \times 10^6 \quad EV = 520 \text{ ml} \quad AV = 20 \text{ ml}$$

$$I.U. = \Delta E/min \times 1400$$

Makrotest:

$$I.U. = \frac{\Delta E/min}{18530} \times 4{,}33 \times 10^6 \quad EV = 2{,}6 \text{ ml} \quad AV = 0{,}6 \text{ ml}$$

$$I.U. = \Delta E/min \times 232$$

3. Placentaextrakt

Danach wurde Placentagewebe mit der Schere zerkleinert und von gröberem Bindegewebe und Eihäuten befreit, mit 0,25 m kalter Rohrzuckerlösung mehrmals gespült, durch Gaze abgegossen und auf Filterpapier getrocknet. Etwa 10 gr wurden mit 30 ml entmineralisiertem Wasser kraftig homogenisiert und 45 Minuten bei 32000 U (Spinco Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert, saulenchromatographisch fraktioniert und die Aktivitäten wie oben angegeben bestimmt.

C. Ergebnisse

1. Elutionsprofile gesunder Nichtschwangerer

Die säulenchromatographische Auftrennung ergab ein in allen Seren ähnliches Elutionsprofil, bei dem sich das Gesamtprotein auf 5 Gipfel verteilte. Dabei stellte sich in einer anschließenden Immunelektrophorese in unserem Labor heraus, daß die Fraktionen I vorwiegend γ-Globulin, II β-Globulin oder Transferrin, III α-Globulin, Albumin, IV α_1-, α_2-, (β-?) Globulin, Albumin und V ein nicht genau zu identifizierendes Protein enthielten. Die aP Aktivitäten wurden jeweils auf diese Proteinfraktionen bezogen.

Die Abb. 2 - 6 zeigen Elutionsprofile gesunder nichtschwangerer Personen. Dabei finden sich in Abb. 2 in Fraktion II und IV je zwei und in Fraktion III, die mit 73,3 % die höchste Aktivität aufweist, drei aP Gipfel (siehe Tabelle III). Eine andere Verteilung zeigt Abb. 3, bei der die II. - V. Fraktion je zweigipflig sind und das Maximum der Aktivität in Fraktion II liegt. In Abb. 4 und 5 verteilt sich die Enzymmenge zu annähernd gleichen Teilen auf die Fraktionen II und III, während sie sich in Abb. 6 in der I. und II. in zwei und in der III. und IV. Fraktion in einem Gipfel findet.

Bei allen 5 nichtschwangeren Personen war nach der Hitzeinaktivierung keine Enzymaktivität mehr nachzuweisen, d.h. also, daß die gemessene aP ausschließlich der hitzelabilen Fraktion angehört. In drei Fällen befand sich die Hauptaktivität in Fraktion III, also bei den α-Globulinen und Albuminen, in zwei Fällen in der Transferrin (β-Globulin) Fraktion. Die Fraktionen I, IV und V wiesen nur geringe Aktivitäten auf.

2. Elutionsprofile gesunder Schwangerer

Abb. 7 - 11 stellen die Elutionsprofile der Seren gesunder Gravider am Termin dar. Während bei den Nichtschwangeren die Enzymgipfel jeweils mit den entsprechenden Proteingipfeln zusammenfielen, liegen hierbei die Maxima der aP in allen 5 Abbildungen hinter dem Proteingipfel der Fraktion II und vor dem Gipfel der Fraktion III. Entsprechend der Konzentrationserhöhung des Enzyms am Ende der Schwangerschaft sind auch bei der Auftrennung höhere Aktivitäten im Serum der Graviden festzustellen.
In Abb. 7, 9 und 10 befinden sich Aktivitäten in den Fraktionen I, II und III, bei Abb. 7 noch zusätzlich in Fraktion V. Allen 5 Elutionsprofilen ist gemeinsam, daß in Fraktion II und III die Hauptmenge der aP lokalisiert ist, wobei das Maximum in der prozentualen Verteilung in 4 Fällen in der II. und nur in Abb. 11 in der III. Fraktion liegt.
Wie zu erwarten war, konnte in den Seren Schwangerer auch die hitzestabile Fraktion nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, daß dieser schwangerschaftsspezifische Anteil der aP sich ähnlich verteilte wie die hitzestabile Fraktion und sich nicht etwa in einer Fraktion sammelt. Auch hier fand sich die größte Menge des Enzyms in Fraktion II und III, nur Abb. 7 und 9 besitzen einen kleinen Gipfel in Fraktion I. Bei allen Patientinnen lag das Maximum der Aktivität in der II. Fraktion, also der Transferrinfraktion. Die Berechnung des Verhältnisses der TaP zur hitzestabilen Fraktion ergab eine Durchschnittsverhältniszahl von 2,2, d.h. also, daß etwa 50 % der aP einer Schwangeren am Termin der hitzestabilen, schwangerschaftsspezifischen aP angehören (siehe Tabelle IV).

3. Elutionsprofile der Placenten

Ein von den übrigen Abbildungen abweichendes Protein-Elutionsprofil zeigt sich in der Fraktionierung von Placentahomogenat (Abb. 12 und 13). Nur in der ersten Elutionsstufe mit 0,0572 m Tris-Puffer konnte ein deutlicher Gipfel eluiert werden, dessen Absorption etwa bei 3 lag. Die übrigen Stufen ergaben nur noch minimale Gipfel. Dagegen steigt die Aktivität der aP etwa auf das 13fache der Aktivität im Serum an. Beide Placenten zeigen ein Verteilungsmuster, bei dem sich sowohl eine hitzelabile als auch eine hitzestabile aP von Fraktion II - V nachweisen läßt und sich jeweils ein deutlicher Gipfel in Fraktion III, IV und V zeigt. Die Hauptaktivität befindet sich auch hier in Fraktion III.

Fraktion	Nicht-Schwangere					Schwangere										Placenta			
						TaP					HSaP					TaP		hi	
	Abb.2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	7	8	9	10	11	12	13	12	13
-	-	-	-	-	12,3	5,5	-	3,3	2,2	-	3,3	-	5,7	-	-	-	-	-	-
II	19,4%	60 %	49,1	59,4	32,4	62,1	50,3	57,7	54,09	48,6	67,5	58,3	50,3	63,1	5 ,1	25,4	3,9	1,8	3,2
III	73,3	11,6	50,8	40,5	51,3	31.07	49,7	38,8	43,7	51,4	27,1	41,7	44,0	36,3	41,2	4 ,1	63,3	51,1	63,1
IV	8,4	5,0	-	-	3,9	1,6	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	25,4	27,0	22,7	26,9
V	-	23,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	6,1	4,3	6,6

Tabelle III

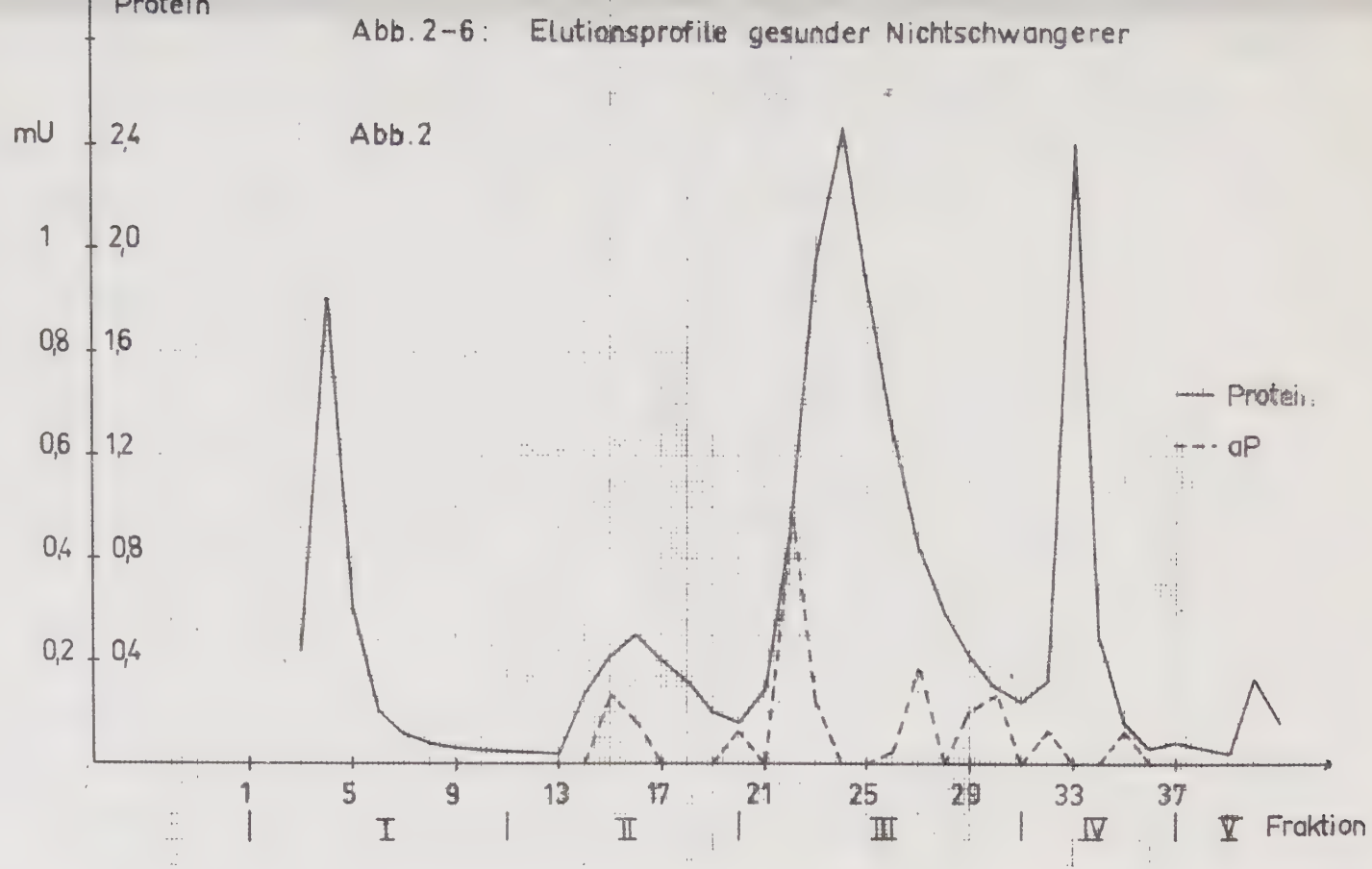
Prozentuale Verteilung der aP Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen

	Fraktion				
Abb.	I	II	III	IV	V
7	3,02	1,82	2,62	1,66	-
8	-	2,4	3,24	-	-
9	1,16	1,16	2,29	1,75	-
10	-	2,5	3,62	-	-
11	-	2,11	3,1	-	-
12	-	2,44	1,8	2,33	2,38
13	-	2,32	2,18	2,13	2,02

Tabelle IV

Verhältnis der TaP zur HSaP in den Fraktionen

Abb. 2-6: Elutionsprofile gesunder Nichtschwangerer



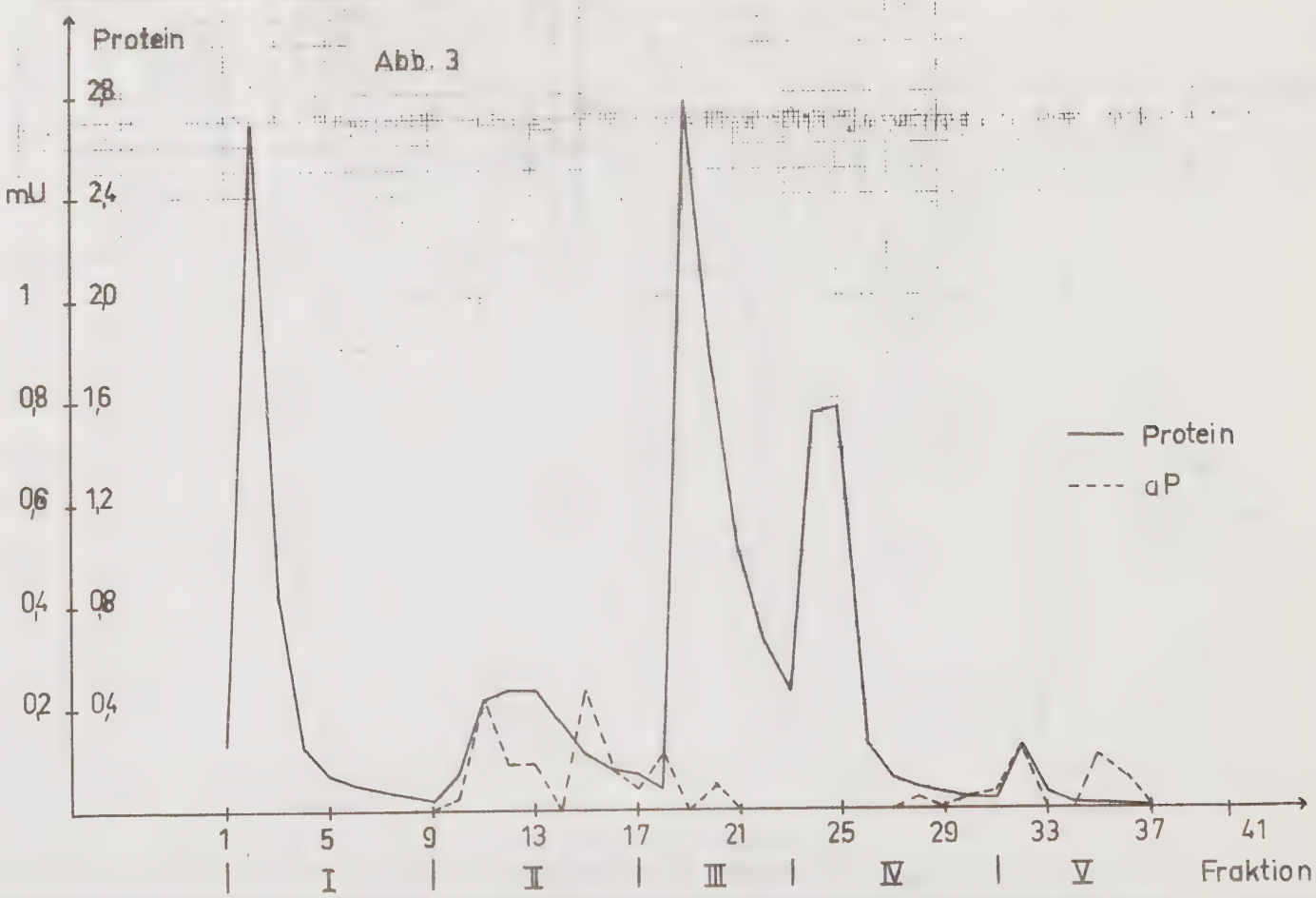
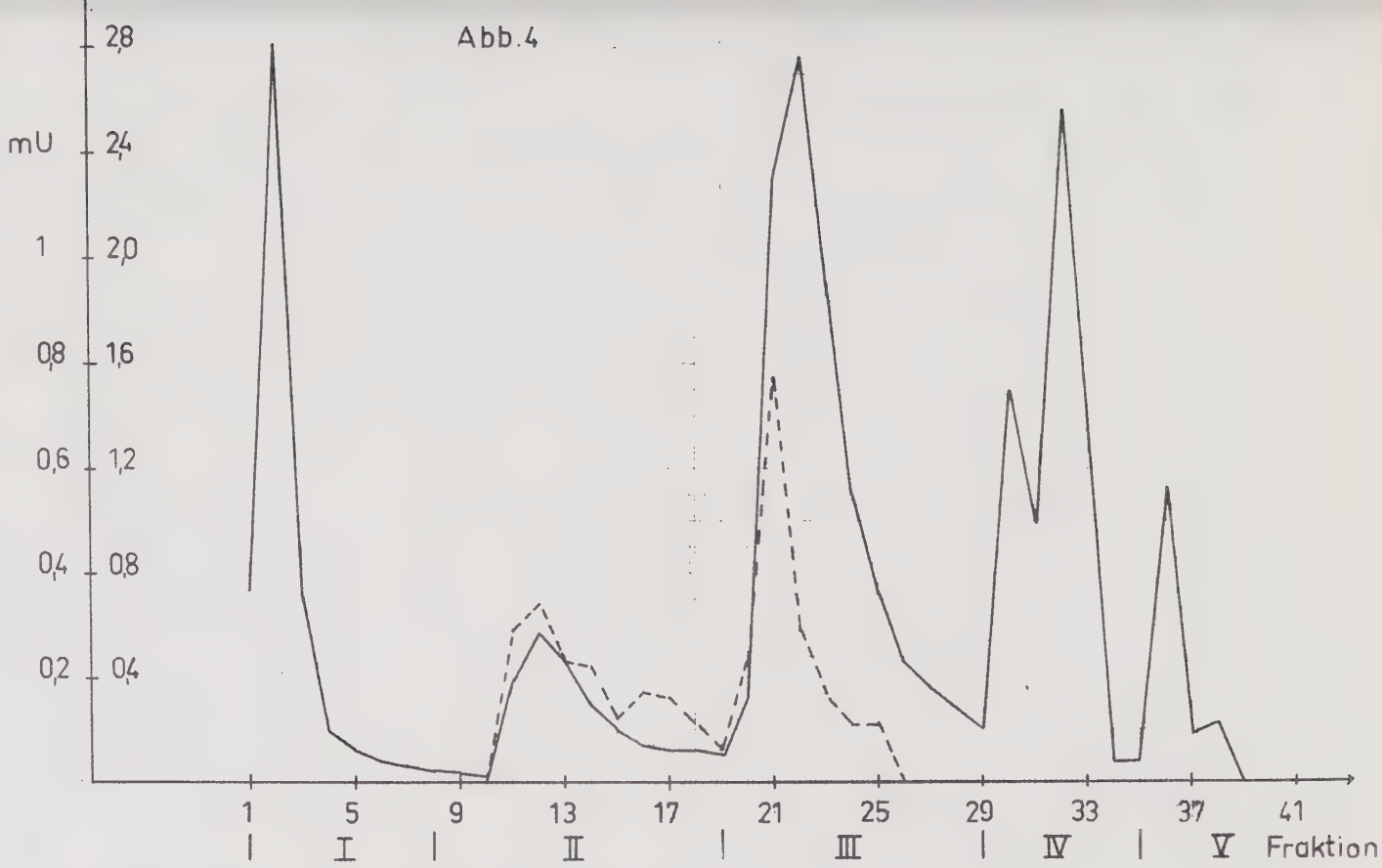
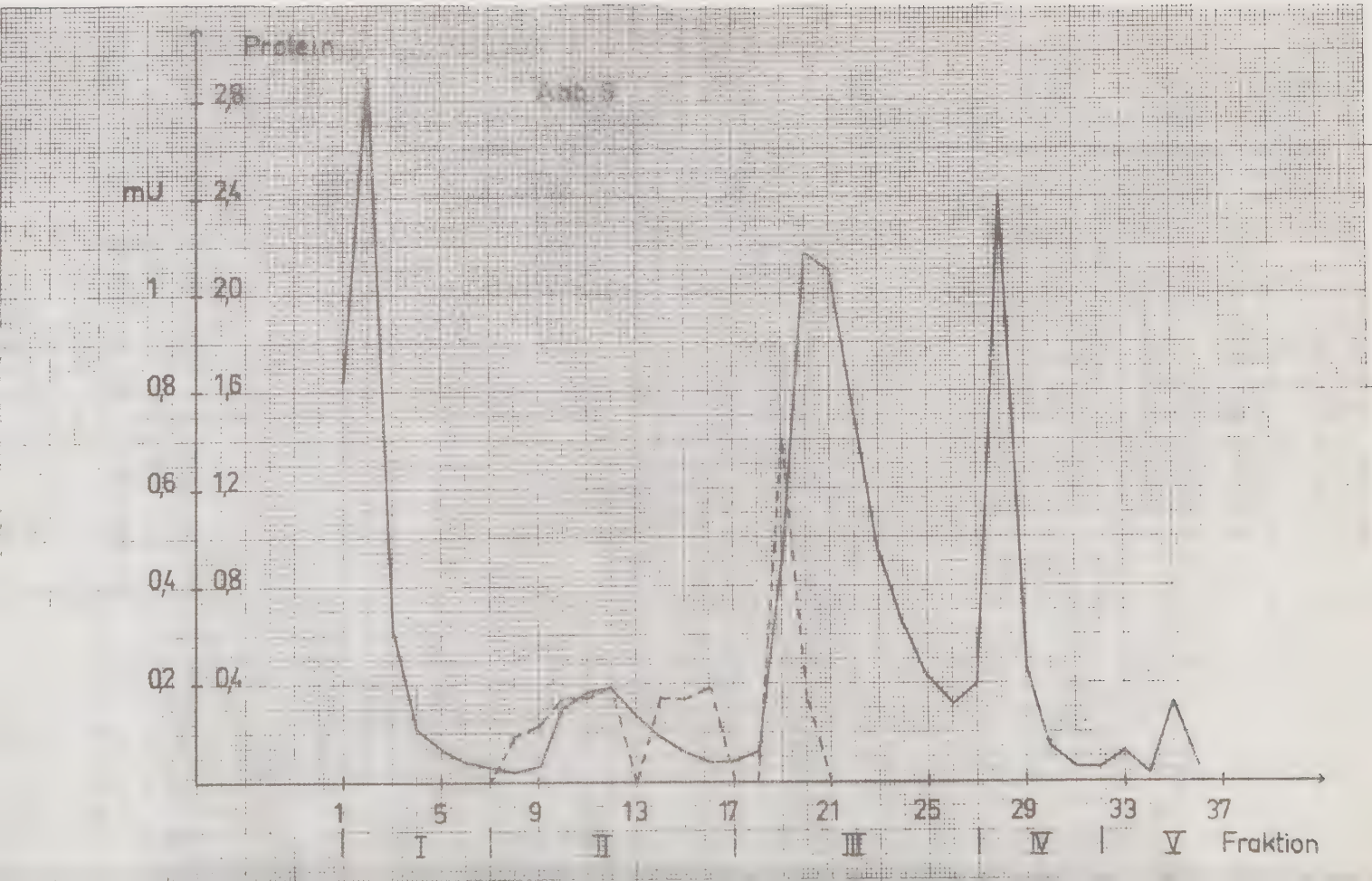

Protein
Abb. 3
mU
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
1
0,8
0,6
0,4
0,2
Protein
aP
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
I
II
III
IV
V
Fraktion

Abb.4


mU
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
1
0,8
0,6
0,4
0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
I
II
III
IV
V
Fraktion


Protein
mU
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
1
0,8
0,6
0,4
0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
I
II
III
IV
V
Fraktion

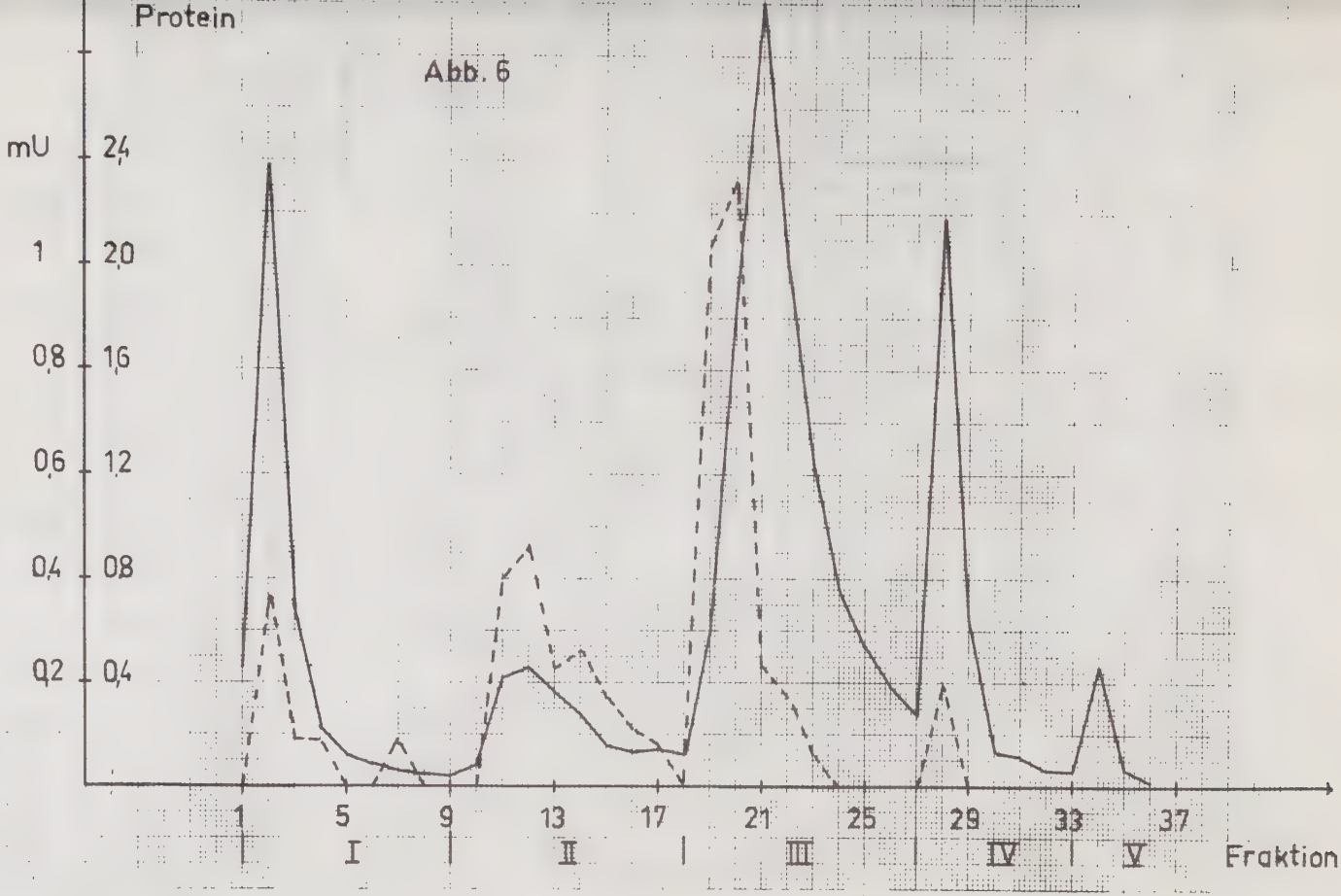

Protein
mU
24
1
20
0,8
16
0,6
12
0,4
08
0,2
04
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
I
II
III
IV
V
Fraktion

Abb. 6

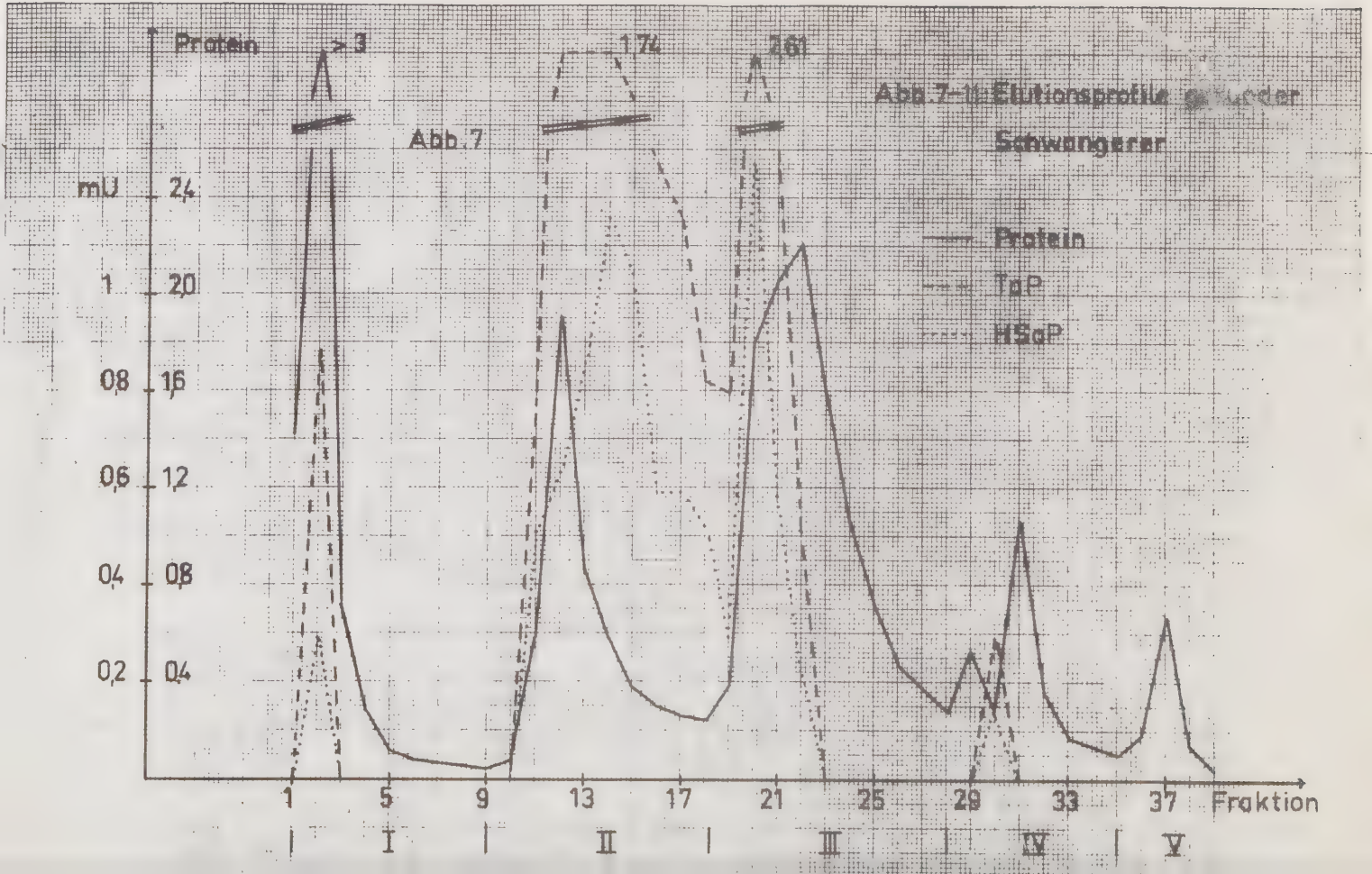
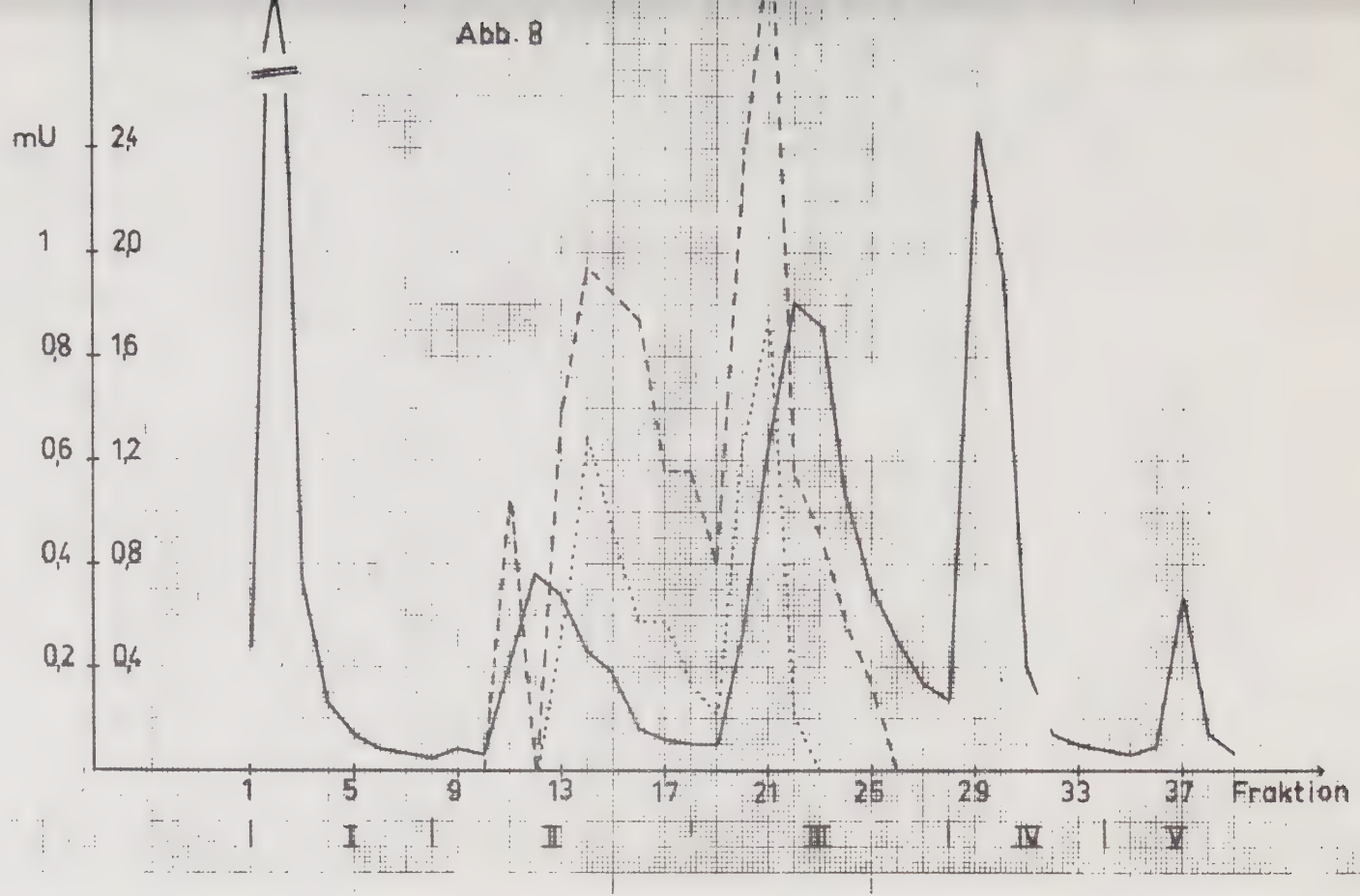
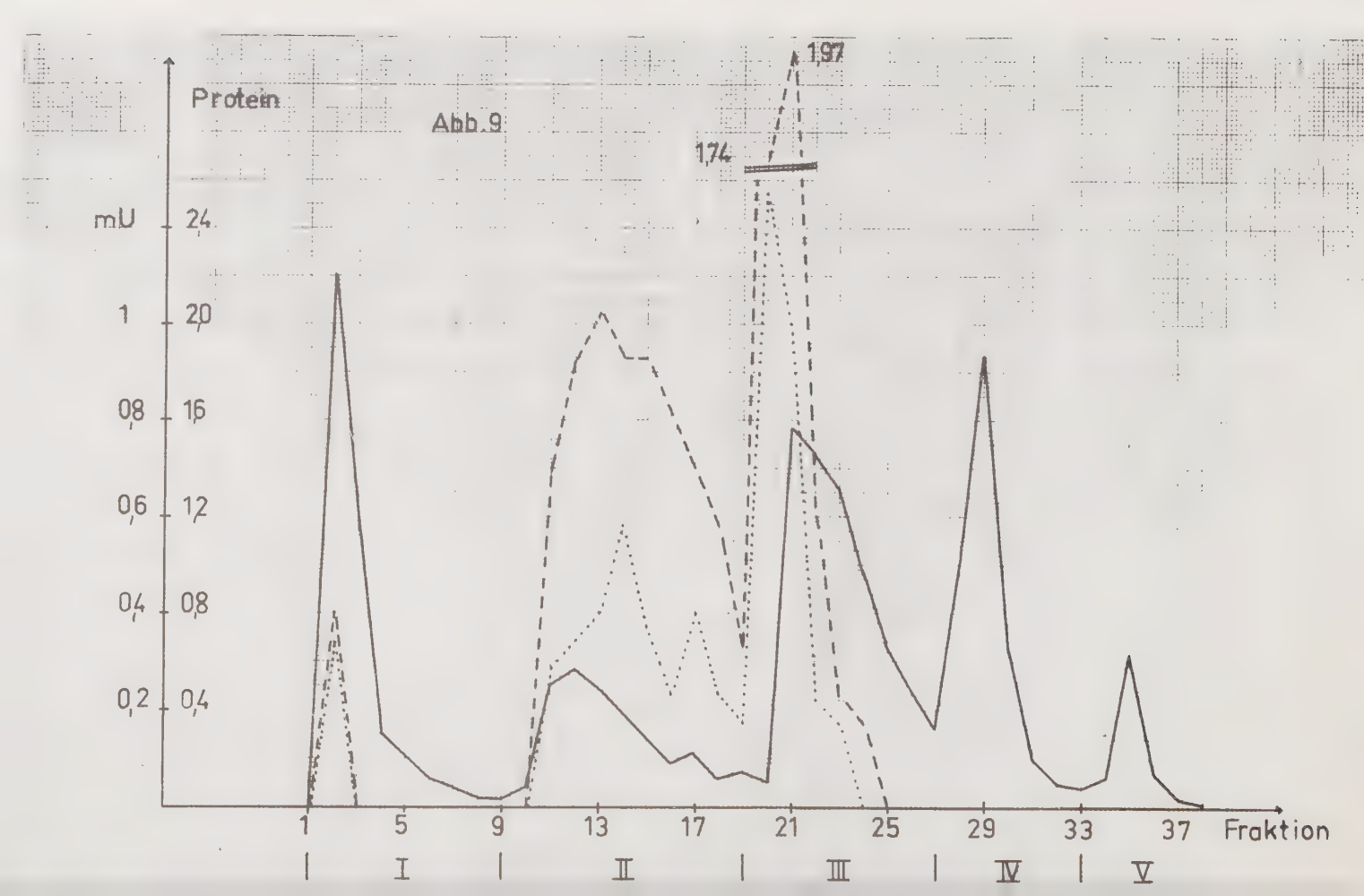
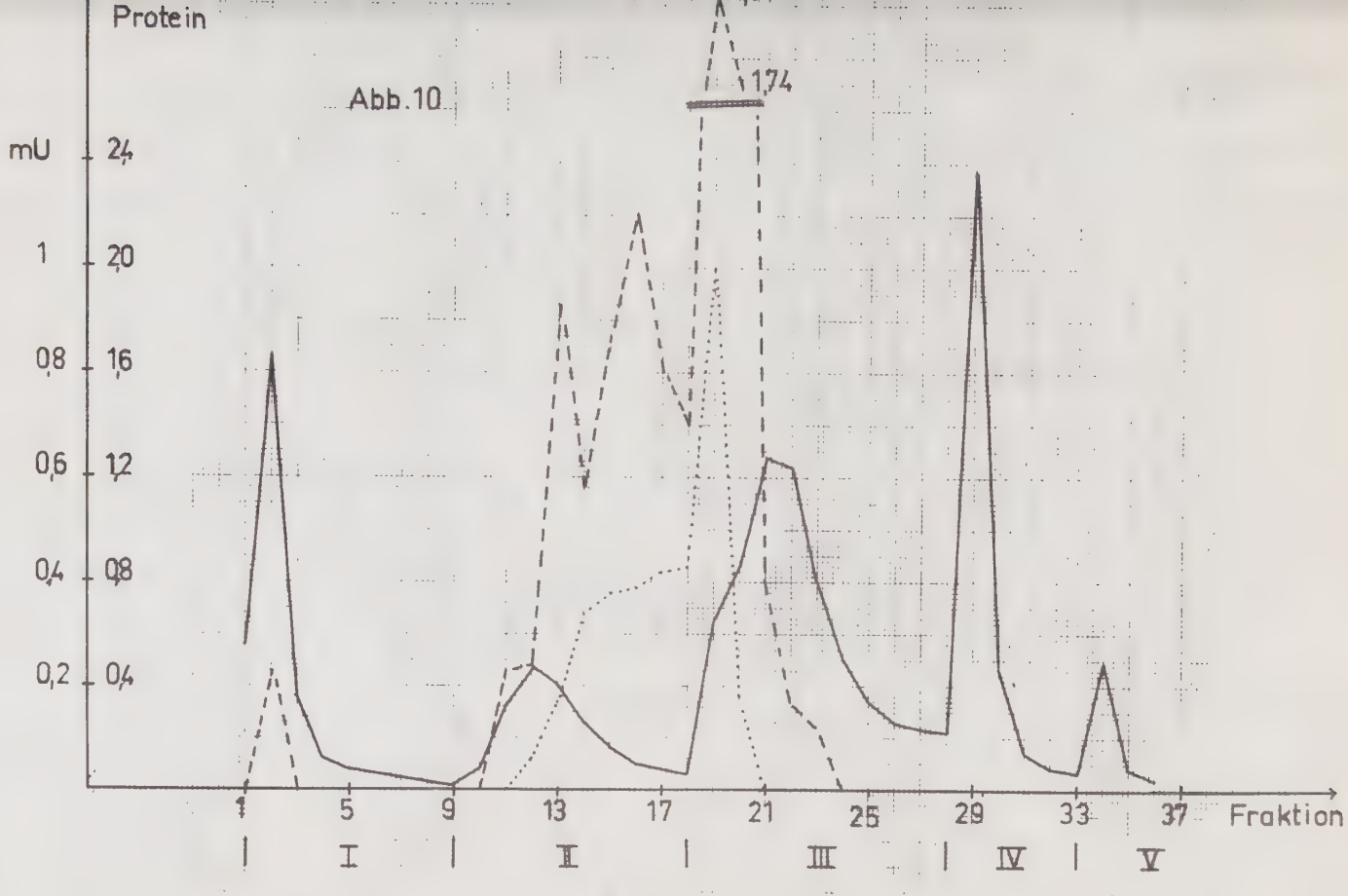
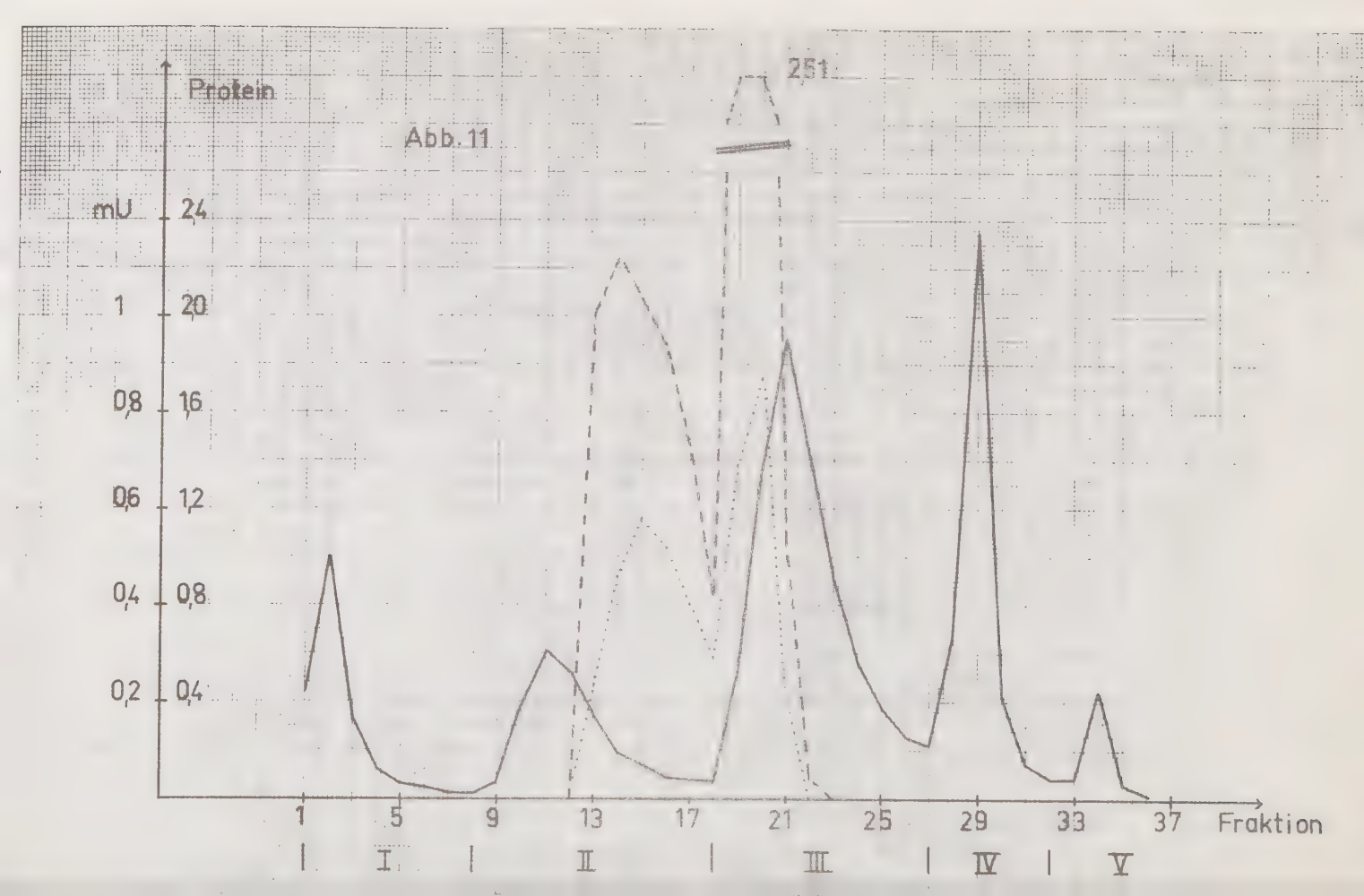

Protein
> 3
1,74
2,61
Abb. 7
Abb. 7-1: Elutionsprofile [illegible] der Schwangerer
Protein
TaP
HSaP
mU
2,4
2,0
1
1,6
0,8
1,2
0,6
0,8
0,4
0,4
0,2
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V

Abb. 8


mU
24
1
20
0,8
16
0,6
1,2
0,4
0,8
0,2
0,4
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein
Abb.9
mU
24
20
16
12
08
04
1
0,8
0,6
0,4
0,2
1,97
1,74
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein
Abb.10
1,74
mU
2,4
1
2,0
0,8
1,6
0,6
1,2
0,4
0,8
0,2
0,4
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V


Protein
Abb. 11
251
mU
24
1
20
0,8
16
0,6
1,2
0,4
0,8
0,2
0,4
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V

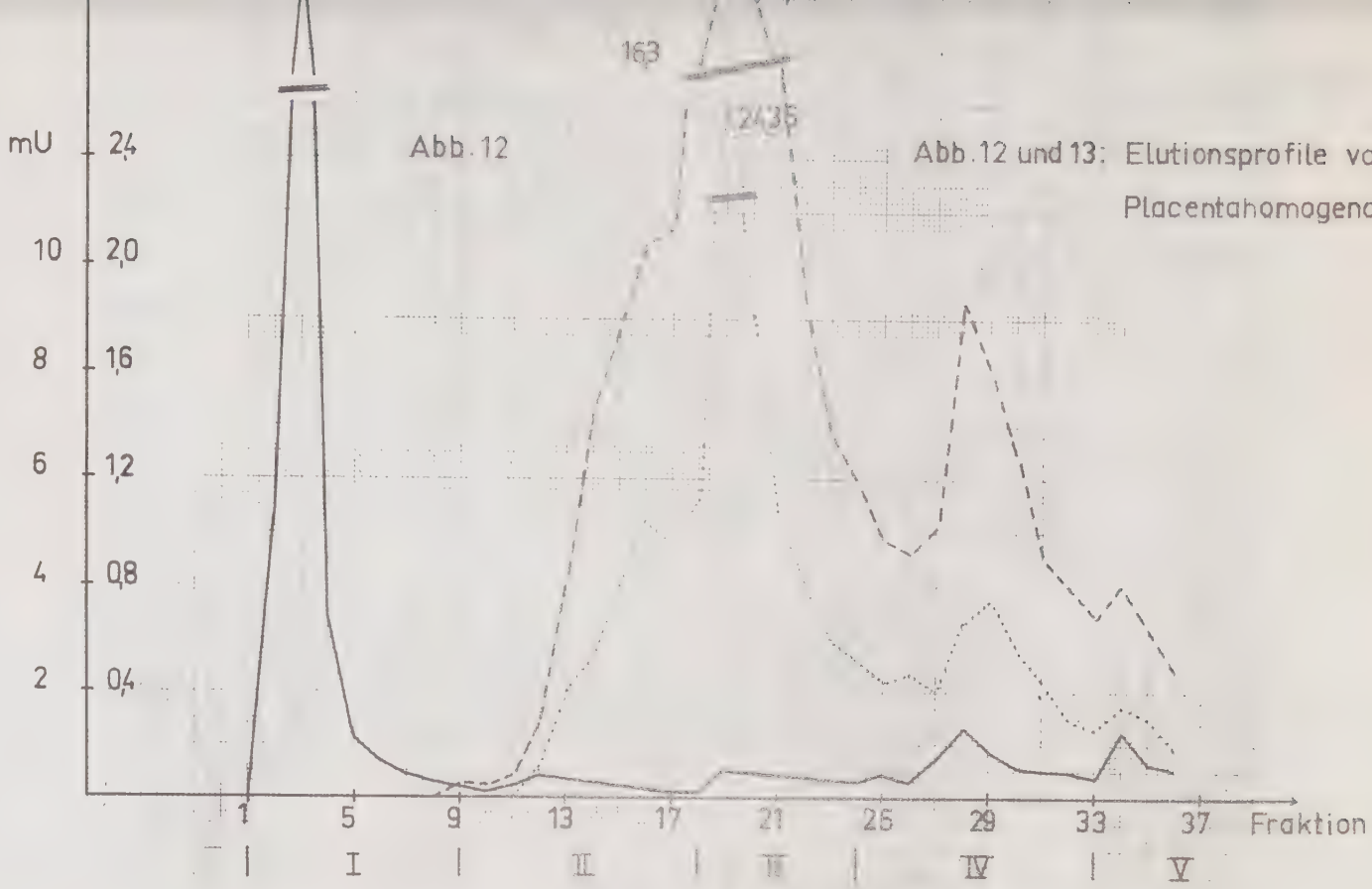
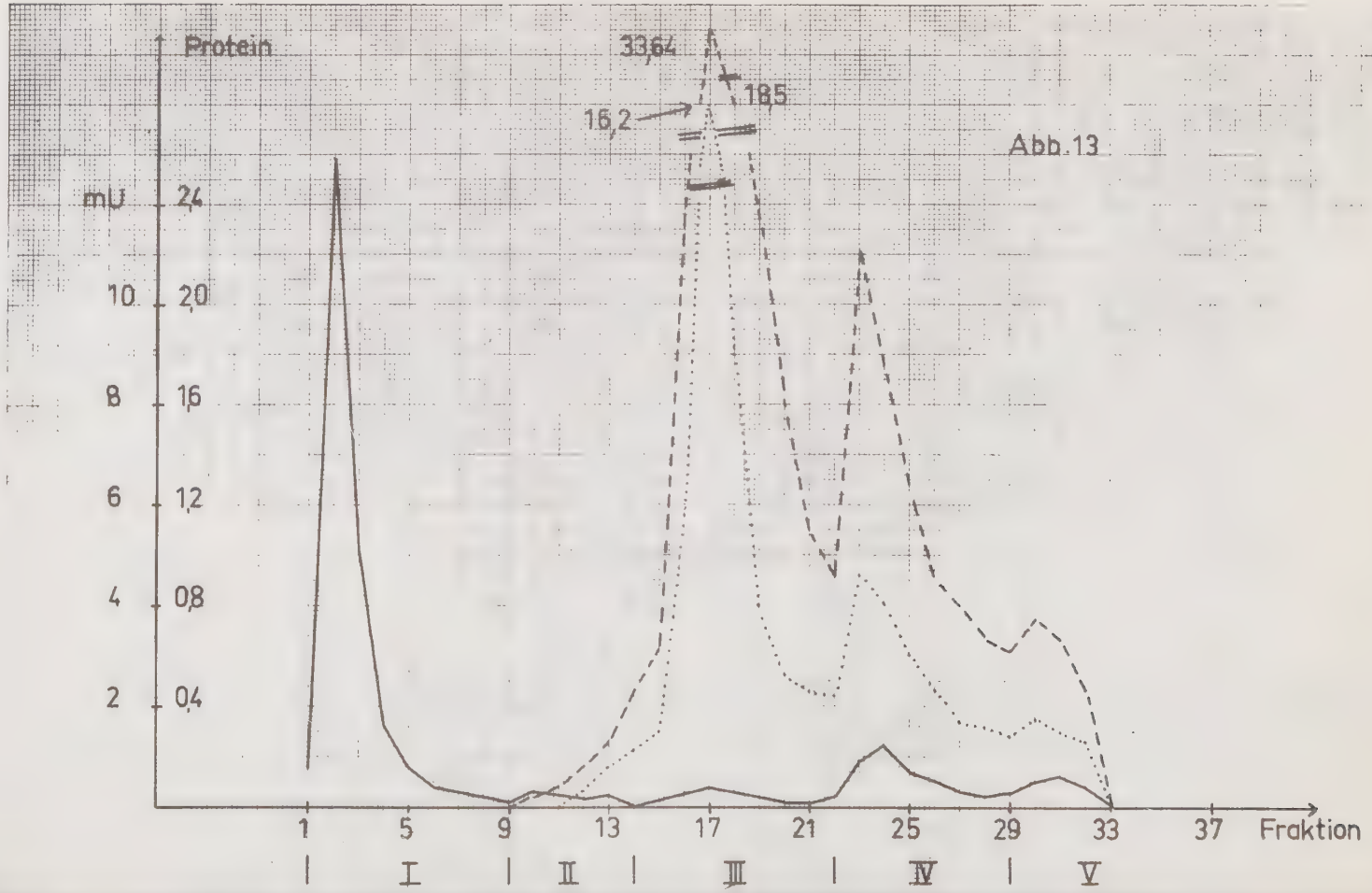


Abb. 12

Abb. 12 und 13: Elutionsprofile von Placentahomogenaten


Protein
33,64
18,5
16,2
Abb.13
mU
24
10
20
8
16
6
12
4
08
2
04
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
Fraktion
I
II
III
IV
V

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die aP im Serum von 8 Nichtschwangeren und 76 schwangeren Frauen bestimmt. Die dabei gefundenen Werte bei Nichtgraviden lagen im Durchschnitt bei 22,4 I.U.. Ähnliche Werte ermittelten Roszkowski (50) (15,77 I.U.), Lee (18) (17,43 I.U.) und Levine (30) (12,45 - 41,35 I.U.). HSaP war in keinem Fall nachweisbar im Gegensatz zu Schwangeren, bei denen zwar die Gesamtaktivität der aP noch im Bereich der Durchschnittswerte Nichtgravider liegt, jedoch schon ein deutlicher hitzestabiler Anteil vorhanden ist. Erst von der 22. Woche an ließ sich ein kontinuierlicher Anstieg der Enzymaktivitätfeststellen, wie er von Messer (39) und Levine (30) beschrieben wurde. Friedman (13) und Levine (29) beobachteten bereits in der 15. Woche eine aP Zunahme, die jedoch erst von der 36. Woche an deutlicher wird. In der 30. - 34. Woche fand sich in der aP ein geringer Abfall, wie ihn auch Jonek (21) und Thomsen (58) beschreiben, während nach Angaben von Lyngbye (33) die Aktivitätsabnahme erst in der 39. Woche erfolgt. Im Gegensatz zu den genannten Autoren steigt aber die Aktivität in der vorliegenden Untersuchung wieder zum Termin hin an, um dann bei 70 I.U. ihr Maximum zu erreichen. Untersuchungen anderer Autoren zeigen Werte, die in einem großen Streubereich liegen. So ermittelte Lee (27) am Termin etwa 44 I.U., Roszkowski (50) 46 I.U., Curzen (7) 72 I.U., Messer (39) 16 - 100 I.U., Zuckerman (63) 133 I.U. und Levine sogar 166 I.U. (29).

Wie bereits oben erwähnt, ließ sich bei allen Schwangeren ein deutlicher hitzestabiler Anteil nachweisen. Bei der Berechnung des Verhältnisses der TaP zur HSaP

konnte bis zur 30. Woche keine Beziehung zwischen den beiden Fraktionen festgestellt werden. Zum Ende der Schwangerschaft hin ergab sich, daß etwa 50 % der TaP der hitzestabilen, schwangerschaftsspezifischen aP zuzurechnen sind. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Beobachtungen von Levine (30) (von 45,65 I.U. waren 24,0 I.U. HSaP), Mc Master (35) und Sussman (52) (HSaP 40 - 67 % der TaP) überein.

Auch im zweiten Teil der Arbeit, bei der die Seren von 50 Schwangeren und zwei Placentahomogenate säulenchromatographisch aufgetrennt und sowohl die TaP als auch die HSaP bestimmt wurden, zeigte sich in allen Fraktionen dieses konstante Verhältnis der TaP zur HSaP.

Von verschiedenen Autoren wurde beschrieben, daß der Anstieg der aP im Serum während der Schwangerschaft einzig auf den in der Placenta neu entstehenden hitzestabilen Anteil der aP zurückzuführen sei. In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch nicht nur eine Erhöhung der HSaP sondern ebenso eine Zunahme des hitzelabilen Anteils. Damit stellt sich die Frage, ob die Placenta tatsächlich einzige Quelle der aP Erhöhung während der Schwangerschaft ist, oder ob nicht, wie auch schon Meade (38) aufgrund elektrophoretischer Untersuchungen diskutierte, die Knochen als zusätzlicher Herkunftsort zu werten seien und die Aktivitätssteigerung auf einer P-Ca-Mobilisation beruhen. Auffallend war es, daß bei der säulenchromatographischen Auftrennung von Placentahomogenat nicht nur der hitzestabile Anteil - wie zu erwarten gewesen wäre - sondern ebenso die labile Fraktion im Verhältnis 1 zu 1 sich fand. Anhand dieses Ergebnisses könnte jedoch die Placenta als alleinige Quelle der aP Erhöhung in Frage kommen, und zwar

als Produktionsort sowohl einer hitzestabilen als auch einer labilen, schwangerschaftsspezifischen aP.

Wie Stark beschrieb, soll die Aktivität in der Placenta etwa 50 mal stärker als im Serum Schwangerer sein (55). Diese Angabe konnte durch vorliegende Untersuchung nicht bestätigt werden, da die Konzentration in den Placentahomogenaten nur etwa 13fach stärker war als im Serum.

Bei der Auftrennung des Serums nichtgravider Personen zeigte sich in 3 Fällen die Hauptenzymaktivität in der α_1-Globulin und Albumin Fraktion. Korner (23), Estborn (10) und Hodson (16) beschreiben ein gleiches Verhalten, während in zwei Fällen die Hauptaktivität wie bei Beobachtungen von Moss (42) und Robinson (49) in der β-Globulin Fraktion lokalisiert ist.

Bei den Schwangeren lag der größte Gipfel in 4 Fällen in der II. Fraktion, also im β-Globulin- oder Transferrinbereich, in einem Fall in der α_1-Globulinzone.

Beckmann (1) und Boyer (3) beschreiben eine schwangerschaftsspezifische Zone, die etwas schneller als Transferrin C wandert, während Meade (38) diese Zone in der α_1-Globulinbande sieht.

Bei den Placentahomogenaten verteilt sich die Enzymaktivität auf die Fraktionen II - IV etwa im Verhältnis 1 : 2 : 1. Damit bietet sich ein völlig anderes Elutionsprofil als bei der Auftrennung des Serums, bei der das Enzym fast gleichmäßig auf Fraktion II und III aufgeteilt ist.

Zur Beurteilung des Verteilungsmusters der HSaP und des labilen Anteils auf die einzelnen Proteinfraktionen muß gesagt werden, daß sich beide Fraktionen gleichmäßig im Verhältnis 1 : 1 in gleichen Gipfeln finden. Ob jedoch das unterschiedliche Placentamuster die alleinige Herkunft der aP aus der Placenta in Frage stellt, kann noch nicht gesagt werden.

E. Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine kurze Beschreibung der aP gegeben und ihre klinische Bedeutung im Serum erläutert. Mit Hilfe der Literatur wurde der Anstieg der aP während der Schwangerschaft und ihre Fraktionierung im Serum un der Placenta dargestellt. Seren von 8 nichtgraviden und 76 graviden Frauen wurden bestimmt und im zweiten Teil der Versuche je 5 Proben von Seren Nichtschwangerer, Schwangerer und zwei Placentahomogenate säulenchromatographisch aufgetrennt. Es stellte sich die Frage nach der Verteilung der HSaP und der labilen aP auf die einzelnen Proteinfraktionen des Serums und einem Vergleich des Ergebnisses mit dem Elutionsprofil von Placentahomogenat. Dabei ergab sich, daß sowohl die HSaP als auch der labile Anteil immer in gleichen Peaks auftreten. Das Verteilungsmuster der Placenta entspricht nicht demjenigen der Seren.

F. Literaturverzeichnis

1) Beckmann L.,Grivea M.: Serum Alkaline Phosphatase in Pregnant Women and newborn Children Acta genet. Basel 15, 218 - 223

2) Birkett D.J., Done J., Neale F.C., Posen S.: Serum Alkaline Phosphatase in Pregnancy: an Immunological Study Brit. med. J.I, 1210 - 1212 (1966)

3) Boyer S.H.: Alkaline Phosphatase in Human Sera and Placenta Science 134, 1002 - 1004 (1961)

4) Curzen P.: Variations in the Enzyme Histochemistry of the Placenta. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth 71, 388 - 399 (1964)

5) Curzen P.: A Histochemical Investigation of the Concept of Placental Insufficiency. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth 74, 385 - 400 (1967)

6) Curzen P., Morris I.: Serum Alkaline Phosphatase in the Hypertensive Disorder of Pregnancy. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth 72, 397 - 401 (1965)

7) Curzen P., Morris I.: Serum Heat-Stable Alkaline Phosphatase in the Hypertensive Disorders of Pregnancy. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth N. S 73, 640 - 646 (1966)

8) Curzen P., Morris I.: Heat-Stable Alkaline Phosphatase in Maternal Serum. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth, Febr. 1968 Vol 75, 151-157

9) Ebbs J.H., Scott W.A., Johnstone W.M.: Blood Phosphatase in Pregnancy an Indication of Twins. Amer. J. Obstet Gynaec 39, 1043 - 1044

10) Estborn B.: Separation of Phosphatase Isoenzyme by Starch-Gel Filtration. Z. für klin. Chemie 2, 53 - 54 /1964

11) Fischman W.H., Green S., Inglis N.I.: L-Phenylalanine: an Organ-Specific Inhibitor of Human Intestinal Alkaline Phosphatase. Nature Lond. 198, 685 - 686 (1963)

12) Frank O., Klemmayer K.: Die alkalische Phosphatase bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und ihre Beeinflussung durch Kortikosteroide Z. für Rheumaforschung 27, 142 (1968)

13) Friedmann M.M., Lapan B., Taylor Th.H.: Variations of Enzyme Activities during normal Pregnancy. Amer. J. Obstet Gynaec 82, 132 - 137 (1961)

14) Hess B.: Enzyme im Blutplasma. Thieme Verlag Stuttgart, 72, 82, 85, 86, 98 - 100 (1962)

15) Hinsberg K. aus: Hoppe-Seyler-Thierfelder Band V B, 173 - 176 Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1953)

16) Hodson A.W.: Iso-Enzymes of Alkaline Phosphatase. Clin chim Acta 7, 255 - 257 (1962)

17) Hoffmann-Ostenhof O., Ehrenreich R. aus: Handbuch der Physiologisch-chemischen Analyse, Hoppe-Seyler-Thierfelder, 962 - 966 Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966)

18) Horky Z.: Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Placenta bei Diabetes mellitus. Zbl. Gynäk. 86, 1474 - 1479 (1964)

19) Humke W.: Isolierung und Verhalten alkalischer Phosphatase in normalen und pathologischen Placenten. Arch. Gynäk. 198, 184 - 186 (1963)

20) Jaecock M.K., Plester J.A., Morris N.F.: The Activity of Alkaline Phosphatase in the Human Placenta. J. Obstet Gynaec of the Brit. Commonwealth 70, 267 - 273 (1963)

21) Jonek J., Skalba H., Klimkiewicz Z., Dzieciuchowicz L.: Histochemical Reactions for Alkaline Phosphatase and for ATP in Human Placenta in Relation to the Period of Pregnancy. Endokr. pol. 16, 301 - 312 (1965)

22) Kitchener P.N.: Alkaline Phosphatase in Maternal and Fetal Sera at Term and during the Puerperium. Amer. J. Clin. Path. 44, 654

23) Korner N.H.: Distribution of Alkaline Phosphatase in Serum Protein Fractions. J. Clin. Path. 15, 195 - 199 (1962)

24) Kotzaurek R., Schobel B.: Das Verhalten der alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im menschlichen Serum bei Skelett und Leber und Gallenwegerkrankungen Klin. Wsc hr. 41, 956 - 961 (1963)

25) Landau W., Schlamowitz M.: Studies of Factors related to the Differentiation of Alkaline Phosphatase derived from several Tissues. Arch Biochem. 95, 474 - 482 (1961)

26) Lauber K., Richterich R.: Kinetische Bestimmung der alkalischen Serum Phosphatase. Ztschr. f. klin. Chem. 4. Jahrgang, Heft 4, Juli 1966, 208 - 211

27) Lee A.B.H., Lewis P.L.: Alkaline Phosphatase Activity in Normal and Toxemic Pregnancies. Amer. J. Obstet. Gynaec 87, 1071 - 1073 (1963)

28) Levine B.: Sex Steroids, Alkaline Phosphatase and Endometrial Carcinoma. J. Obstet and Gynec 22, 563 - 566 (1963)

29) Levine B.,Wood W.A.: Maternal Serum Alkaline Phosphatase and Placental Function. Amer. J. Obstet Gynec 91, 967 - 971 (1965)

30) Levine B., Ely C.W.,
Wood W.A.: Assessment of Fetal Maturity by Maternal Serum Alkaline Phosphatase Analysis. Amer. J. Obstet Gynec 96, No 8, 1155 - 1158 (1966)

31) Linhart K.,
Walter K. aus: Bergmeyer H.U.: Enzymatische Analyse, S. 783 Verlag Chemie GMBH Weinheim/ Bergstr. 1962

32) Lobel B.L.,Deane H.W.,
Romney S.L.: Enzymic Histochemistry of the Villous Portion of the Human Placenta from six Weeks of Gestation to Term. Amer. J. Obstet Gynec 83, 295 - 299 (1962)

33) Lyngbye M.Chr.,
Christofferson B.: Thermostable Serum Alkaline Phosphatase in Normal and Pathological Pregnancy Dan med bull 15, 13 - 18 (1968)

34) Mc Kay aus: C.A. Villee: The Placenta and Fetal Membranes New York 1960

35) Mc Master Y.,
Tennant R.,
Clubb J.S.,
Neale F.C.,Posen S.: The Mechanism of the Elevation of Serum Alkaline Phosphatase in Pregnancy. J. Obstet Gynaec Brit. Commonwealth 71, 735 - 739 (1964)

36) Meranze T.,
Meranze D.R.,
Rothmann M.M.: Blood Phosphatase in Pregnancy, Amer. J. Obstet Gynec 33, 444 (1937)

37) Miller Z.B., Naor E.,
Milkovich L.,
Schmidt W.M.: Serum Levels of CAP, LAP and AP in Single and Twin Pregnancies Obstet Gynec 24, 707 - 715 (1964)

38) Meade B.W.,
Rosalki S.B.: The Origin of Increased Maternal Serum Enzyme Activity in Pregnancy and Labour. J. Obstet Gynaec Brit. Commonwealth 70, 862 - 868 (1963)

39) Messer R.H.: Heat-Stable Alkaline Phosphatase as an Index of Placental Function. Amer. J. Obstet Gynec 98, No 4, 459 - 465

40) Moss D.W.: Heterogenity of Human Alkaline Phosphatase Nature (Lond) 200, 1206 - 1207 (1963)

41) Moss D.W., King E.J.: Properties of Alkaline Phosphatase Fractions separated by Starch-Gel-Electrophoresis. Biochem. J. 84, 192 - 195 (1962)

42) Moss D.W., Campbell D.H., Anagnostou-Karakas E., King E.J.: Characterization of Tissue Alkaline Phosphatase and their Partial Purification by Starch-Gel-Electrophoresis. Biochem. J. 81, 441 - 447 (1961)

43) Moss D.W., Campbell D.H., Anagnostou-Karakas E., King E.J.: Separation and Characterization of Alkaline Phosphatase Isoenzymes from Blood and other Tissues Pure appl. Chem. 3, 397 - 402 (1961)

44) Ober K.G., Weber M.: Beitrag zur Progesteronwirkung. Klin. Wschr. 29, 53 - 55 (1951)

45) Posen S., Neale F.C., Clubb J.S.: Heat Inactivation in the Study of Human Alkaline Phosphatase. Ann internal med 62, 1234 (1965)

46) Repina M.A.: The Activity of Alkaline Phosphatase during Pregnancy. Akus i Ginek 39, Nr. 1, 107 - 110 (1963)

47) Richterich R.: Klin. Chemie Theorie und Praxis, Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M. 1965, 133, 249

48) Robinson J.C., Pierce J.E.: Differential Action of Neuraminidase on Human Serum Alkaline Phosphatase. Nature (Lond) 204, 472 - 473 (1964)

49) Robinson J.C., Pierce J.E., Blumberg B.S.: The Serum Alkaline Phosphatase of Pregnancy. Amer. J. Obstet Gynec 94, 559 - 565 (1966)

50) Roszkowski J.: The Alkaline Phosphatase Activity in the I., II. and III. Trimesters of Pregnancy. Ginek pol 37, 265 - 271 (1966)

51) Roszkowski J.: The Interdependance between the Alkaline Phosphatase Activity an the Urinary Estrogens Excretion in the III Trimesters of Pregnancy and the State of Newborn. Ginek pol 37, 945 (1966)

52) Sussman H.H.: Placental Alkaline Phosphatase in Maternal Serum during Normal and Abnormal Pregnancy Nature (Lond) 218, No 5139, 359

53) Sussman H.H., Small P., Cotlove E.: Human Alkaline Phosphatase Immunochemical Identification of Organ Specific Isoenzymes. J. of Biol. Chem. 243, No 1, 160 - 166 (1968)

54) Schlamowitz M., Bodanski O.: Tissue Sources of Human Serum Alkaline Phosphatase as determined by Immunochemical Procedures. J. biol Chem. 234, No 6, 1433 - 1437 (1959)

55) Stark G., Jung W.: Phosphatasen in normalen Placenten, Arch. Gynäk 187, 398 - 405 (1956)

56) Stark G., Jung W.: Phosphatase in den Zellstrukturen der Placenta bei pathologischen Schwangerschaften. Arch. Gynäk 191, 437 - 441 (1959)

57) Stark G., Jung W.: Über die Ursache der Phosphatase Erhöhung in der Spätschwangerschaft. Zbl. Gynäk 78, 1201 - 1206 (1956)

58) Thomsen K.: Über die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der menschlichen Placenta. Arch. Gynäk 187, 1 - 19 (1955)

59) Warnock M.: Alkaline Phosphatase in Tissue and Serum. Clin chim Acta 14, 156 (1966)

60) Watson D., Weston W., Porter R.: Plasma Alkaline Phosphatase in Normal and Abnormal Terminal Pregnancy. Enzym. biol. (Basel) 5, 25 - 28 (1965)

61) Westone H.J., La Motta R.V., Middlebrock L., Tennant R., White B.: Studies of Cholinesterase Activity IV Liver Function in Pregnancy, Values of certain Standard Liver Function Tests in Normal Pregnancy. Amer. J. Obstet Gynec 76, 480 - 490 (1958)

62) Zuckerman H., Sadovski E.: Thermostable Alkaline Phosphatase in Pregnancy. Israel J. med Sci 1, 230 - 234 (1965)

63) Zuckerman H., Sadovski E., Kallner B.: Serum Alkaline Phosphatase in Pregnancy and Puerperium. Obstet Gynec 25, 819 - 824 (1965)

Lebenslauf

Am 19. November 1944 wurde ich, Uta Bowe, als Tochter des Telegrapheninspektors Gustav Bowe und seiner Frau Luise, geborene Dießel, in Norden/Ostfriesland geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1955 bis zum Abitur in Osnabrück die Ursula-Schule. 1964 begann ich mit dem Medizinstuidium in Tübingen. Dort bestand ich 1965 das Vorphysikum und 1966 das Physikum. Nach einem Semester in Hamburg setzte ich das Studium in Tübingen fort und bestand im Februar 1970 das Staatsexamen.

Lebenslauf

Am 19.November 1944 wurde ich als Tochter des Telegrapheninspektors Gustav Bowe und seiner Frau Luise,geborene Dießel,in Norden/Ostfriesland geboren.Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1955 bis zum Abitur in Osnabrück die Ursula-Schule.1964 begann ich mit dem Medizinstudium in Tübingen.Dort bestand ich 1965 das Vorphysikum und 1966 das Physikum.Nach einem Semester in Hamburg setzte ich das Studium in Tübingen fort und bestand im Februar 1970 das Staatsexamen.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681